

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
30. Januar 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/008974 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/543,  
21/64, 33/58, 33/60, C12Q 1/68

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLAPPROTH, Holger [DE/DE]; Kehlerstrasse 12, 79108 Freiburg (DE).  
LEHMANN, Mirko [DE/DE]; Runzstrasse 71, 79102 Freiburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/08021

(22) Internationales Anmeldedatum:  
18. Juli 2002 (18.07.2002)

(74) Anwalt: TEIPEL, Susanne; Schwabe, Sandmair, Marx,  
Stuntzstrasse 16, 81677 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, JP, KR, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:  
101 33 844.9 18. Juli 2001 (18.07.2001) DE

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Engesserstrasse 4b, 79108 Freiburg (DE). MICRONAS GMBH [DE/DE]; Hans-Bunte-Strasse 19, 79108 Freiburg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 03/008974 A1

(54) Title: BIOSENSOR AND METHOD FOR DETECTING ANALYTES BY MEANS OF TIME-RESOLVED LUMINESCENCE

(54) Bezeichnung: BIOSENSOR UND VERFAHREN ZUR DETEKTION VON ANALYTEN MITTELS ZEITAUFGELÖSTER LUMINESZENZ

(57) Abstract: The invention generally relates to a biosensor in the form of a microchip for optically detecting analytes, and to a method using said biosensor. The invention especially relates to biosensors for detecting an analyte by means of time-resolved luminescence measurement, and to a corresponding method.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein einen Biosensor in Form eines Mikrochips zur optischen Detektion von Analyten und ein diesen Biosensor verwendendes Verfahren. Insbesondere betrifft die Erfindung Biosensoren zur Detektion eines Analyten durch zeitaufgelöste Lumineszenzmessung und ein entsprechendes Verfahren.

## BIOSENSOR UND VERFAHREN ZUR DETEKTION VON ANALYTEN MITTELS ZEITAUFGELÖSTER LUMINESZENZ

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein einen Biosensor in Form eines Mikrochips zur optischen Detektion von Analyten und ein diesen Biosensor verwendendes Verfahren. Insbesondere betrifft die Erfindung Biosensoren zur Detektion eines Analyten durch zeitaufgelöste Lumineszenzmessung und ein entsprechendes Verfahren.

Stand der Technik

Zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis des Vorhandenseins von bestimmten Substanzen wie z.B. Biomolekülen in einer zu analysierenden Probe ist die Verwendung von im wesentlichen planaren Systemen bekannt, welche in der Fachwelt als Biosensoren bzw. Biochips, d.h. Biosensoren in Form von Mikrochips bezeichnet werden. Diese Biochips umfassen einen Träger, auf dessen Oberfläche i.d.R. eine Vielzahl von zumeist rasterartig angeordneten Nachweisfeldern ausgebildet ist, wobei sich die einzelnen Felder oder Bereiche bzw. Bereichsgruppen jeweils durch ihre Spezifität gegenüber einem bestimmten nachzuweisenden Analyten voneinander unterscheiden. Im Falle von nachzuweisenden DNA-Analyten befinden sich innerhalb der einzelnen Bereiche der Trägeroberfläche – direkt oder indirekt immobilisiert – spezifische Nukleinsäuresonden wie z.B. Oligonukleotide oder cDNA in zumeist einzelsträngiger Form, deren jeweilige Spezifität gegenüber der nachzuweisenden Nukleinsäure im wesentlichen durch die Sequenzabfolge (Sondendesign) vorgegeben ist. Die auf diese Weise funktionalisierte Mikrochipoberfläche wird im Rahmen eines entsprechenden Nachweisverfahrens mit der die nachzuweisenden DNA-Analyten möglicherweise enthaltenden Probe unter Bedingungen in Kontakt gebracht, welche im Falle des Vorhandenseins der zuvor nachweisbar markierten Zielnukleinsäure(n) deren Hybridisierung mit den immobilisierten Sondenmolekülen gewährleisten. Die qualitative und ggf. quantitative Detektion eines bzw. mehrerer spezifisch gebildeter Hybridisierungskomplexe erfolgt anschließend zumeist durch optische Lumineszenzmessung und Zuordnung der erhaltenen Daten zu den jeweiligen Nachweisfeldern, wodurch die Bestimmung der Anwesenheit des bzw. der DNA-Analyten in der Probe und ggf. deren Quantifizierung ermöglicht wird.

Diese Technologie kann bekanntermaßen auch für die Detektion anderer nachweisbar markierter Analyte wie insbesondere proteinöser Substanzen (Peptide, Proteine, Antikörper, funktionelle Fragmente derselben) eingesetzt werden, sofern die Nachweisreaktion auf der Messung von Lumi-

neszenzdaten beruht. So ist beispielsweise bekannt, dass die Aminosäure Tyrosin eine Eigenfluoreszenz aufweist, deren Halbwertszeit nach einer Anregung bei ca. 260 nm eine erfindungsgemäße Anwendung ermöglicht, und zwar auch ohne zusätzliche Markierung einer Tyrosin-Reste aufweisenden proteinösen Substanz. So können durch Verwendung von Peptiden als Fängermolekül proteinöse Substanzen wie z.B. Antikörper oder Fragmente derselben als Analyten nachgewiesen werden, und zwar auch ohne diese zuvor mit einem geeigneten Luminophor markiert zu haben.

Mit anderen Worten kann mit dieser Technologie jedweder lumineszenzgestützte Nachweis eines Komplexes aus einem nachweisbar markierten Analyten (Komponente aus der zu analysierenden Probe) und einem Fängermolekül (immobilisierte Trägerkomponente) durchgeführt werden, wobei auch solche Systeme umfasst sind, bei denen sich der Analyt bereits durch eine nachweisbare Eigenfluoreszenz auszeichnet und daher keiner weiteren Markierung bedarf.

Ferner kann diese Technologie auf die Messung von Schadstoffen wie polyzyklischen Kohlenwasserstoffen oder anderen organischen Substanzen angewandt werden. Es ist bekannt, dass zahlreiche Vertreter der Gruppe der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe eine Fluoreszenzhalbwertszeit von bis zu 450 ns aufweisen und demgemäß als Analyten – auch ohne zusätzliche Markierung – ausgewählt werden können (beispielsweise Pyren bei Anregung mit 336 nm). Diese polyzyklischen Kohlenwasserstoffe können somit nachgewiesen werden, indem sie als Analyten an speziell produzierte Antikörper als Fängermoleküle binden und nach geeigneter Anregung ein Lumineszenzsignal liefern.

Die auf Lumineszenz-Nachweis basierenden und im Stand der Technik bekannten Systeme umfassen neben dem eigentlichen Biochip bzw. Sensorchip insbesondere Vorrichtungen zur Erfassung, Weiterleitung und Auswertung der Lumineszenzsignale. Die am Markt befindlichen Produkte sind jedoch aufgrund der Anzahl der erforderlichen Systemkomponenten sowie einer damit verbundenen hohen Komplexität relativ teuer und können im wesentlichen nicht mehr weiter miniaturisiert werden.

Die WO 99/27 140 beschreibt einen Biosensor in Form eines Mikrochip, umfassend integrierte Detektoren und wahlweise eine integrierte Anregungsquelle, der zur Detektion einer Vielzahl biologischer Analyten mittels Lumineszenzmessung verwendet wird. Die Druckschrift lehrt bei der Lumineszenzmessung in jedem Fall die parallele Anregung und Messung. Dies hat zwangs-

läufig zur Folge, dass auf dem Biosensor zwischen der Oberfläche, auf der der Luminophor immobilisiert ist, und dem Detektor ein Wellenlängenfilter zwischengeschaltet ist, um das Anregungslicht auszublenden und selektiv das emittierte Lumineszenzlicht erfassen zu können. Dieser zwingend vorgesehene Filter verringert die Lichtausbeute und/oder macht die Herstellung des Biosensors aufwendiger.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung neuer Biosensoren der zuvor beschriebenen Art, mit denen die Nachteile der im Stand der Technik bekannten Systeme überwunden werden.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein empfindlicheres Verfahren für die Detektion bzw. den Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probe bereitstellen zu können, von der man annimmt, dass sie diesen oder diese enthält.

#### Zusammenfassung der Erfindung

Gelöst wird die erfindungsgemäße Aufgabe durch einen optischen Biosensor in Form eines Mikrochip zur Detektion eines Fänger/Analyt-Komplexes mittels Lumineszenz, der Biosensor umfassend (a) einen Träger mit einer Oberfläche, auf der mindestens eine Art von Fängermolekül immobilisiert ist, (b) mindestens einen, vorzugsweise mehrere Detektor(en), der durch die Oberfläche hindurchtretendes Licht detektieren kann, und (c) wahlweise mindestens eine Anregungsquelle, die die Emission von Lumineszenzlicht induzieren kann, worin die Oberfläche die Messoberfläche des Detektors oder eine Oberfläche einer ohne zwischengeschalteten Wellenlängenfilter für Licht der Anregungsquelle oder Anregungswellenlänge über dem Detektor angeordneten Schicht ist.

Vorzugsweise umfasst der Biosensor eine oder mehrere Anregungsquelle(n), die einen Luminophor zur Emission von Lumineszenzlicht induzieren kann/können und am meisten bevorzugt in den Biosensor integriert ist/sind.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform ist der Mikrochip monolithisch ausgestaltet und ist bzw. sind der oder die Detektor(en) in den Träger integriert. Alternativ kann bzw. können der oder die Detektor(en) in Form einer Folie auf den Träger aufgeklebt sein.

Der oder die Detektor(en) kann bzw. können alternativ in der Nähe der Oberfläche, ggf. jedoch räumlich von dieser beabstandet angeordnet sein. Am meisten bevorzugt ist der Abstand zwischen der Oberfläche (= Ort der Siganlentstehung/Lumineszenzlichtemission) und der Messoberfläche des Detektors (= Ort der Signaldetektion) nicht größer als 10  $\mu\text{m}$ , stärker bevorzugt nicht größer als 5  $\mu\text{m}$ , am meisten bevorzugt nicht größer als 1  $\mu\text{m}$ .

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die mindestens eine Art von Fängermolekülen auf der Oberfläche in einzelnen Nachweisfeldern oder in Form eines Rasters immobilisiert ist. Stärker bevorzugt sind mehrere Arten von Fängermolekülen auf der Oberfläche immobilisiert. Am meisten bevorzugt sind unterschiedliche Arten von Fängermolekülen auf unterschiedlichen Nachweisfeldern oder distinkten Positionen des Rasters immobilisiert.

Die Fängermoleküle sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge, Haptenen, Proteinen, Peptiden, Antikörpern oder deren Fragmenten, Zuckerstrukturen, Rezeptoren oder Liganden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann der erfindungsgemäße Biosensor zusätzlich eines oder mehrere Elemente aus der Gruppe, bestehend aus einer Steuereinheit, mindestens einem Verstärker, einem oder mehreren Signalwandlern, einer oder mehreren Speichereinheiten, einem oder mehreren Filtern, einer Optik, Lichtleitern und einer oder mehreren Schutzschichten umfassen; dies mit der Maßgabe, dass zwischen dem oder den Detektoren und der Oberfläche des Trägers, auf der die Fängermoleküle immobilisiert sind, kein Wellenlängenfilter für Licht der Anregungsquelle oder der Anregungswellenlänge angeordnet oder zwischengeschaltet ist.

Umfasst der erfindungsgemäße Biosensor mehrere Detektoren, ist vorzugsweise jeder Detektor einem Feld bzw. einer Position des Rasters zugeordnet, stärker bevorzugt indem er unter diesem Feld bzw. der Position angeordnet ist und die Größe der Messoberfläche der Feldgröße im Wesentlichen entspricht.

Hierbei bevorzugt ist eine Ausführungsform, worin die Fängermoleküle innerhalb einer Vertiefung der Oberfläche des Trägers auf dem Boden derselben angeordnet sind, wobei der Boden der Vertiefung gegenüber der Oberfläche um mindestens 100 nm eingesenkt wird.

Die Erfindung betrifft gleichermaßen ein Verfahren zum Nachweis eines Analyt/Fänger-Komplexes mittels zeitaufgelöster Lumineszenz unter Verwendung eines optischen Biosensors in Form eines Mikrochips, der Biosensor umfassend (a) einen Träger mit einer Oberfläche, auf der mindestens eine Art von Fängermolekül immobilisiert ist, (b) mindestens einen, vorzugsweise mehrere Detektor(en), der durch die Oberfläche hindurchtretendes Licht detektieren kann, und (c) wahlweise mindestens eine Anregungsquelle, die die Emission von Lumineszenzlicht induzieren kann, das Verfahren umfassend die Schritte (1) bis (3), worin in Schritt (1) für eine Anregungszeit  $T_1$  an die Fängermoleküle gebundene Luminophore und/oder der Analyt/Fänger-Komplex in einen angeregten Zustand überführt werden, in Schritt (2) für eine Karenzzeit  $T_2$  im wesentlichen nicht angeregt wird und danach in Schritt (3) für eine Zeitspanne  $T_3$  (Messdauer) emittiertes Lumineszenzlicht von dem mindestens einen Detektor detektiert und zum Nachweis des Komplexes ausgewertet wird.

Nach einer Ausführungsform können in Schritt (3) verschiedene Analyt/Fänger-Komplexe bspw. durch parallele Detektion von Lumineszenzlicht unterschiedlicher Wellenlängen parallel nachgewiesen werden. Ebenso kann das Verfahren zusätzlich einen Schritt (4) umfassen, in dem für eine anschließende zweite Messdauer  $T_4$  emittiertes Lumineszenzlicht einer anderen als der in Schritt (3) detektierten Wellenlänge detektiert und zum Nachweis eines zweiten Komplexes ausgewertet wird.

In allen oben genannten Fällen ist ein Verfahren bevorzugt, worin die Anregung nur in Schritt (1) erfolgt. Die Schritte (1) bis (3) oder (1) bis (4) können mehrfach durchgeführt werden.

Das beschriebene erfindungsgemäße Verfahren kann zusätzlich einen vorgelagerten Schritt des Inkontakt-bringens der Fängermoleküle mit einer Probe, von der man annimmt, dass sie einen Liganden der Fängermoleküle (= Analyt) enthält, und ggf. Waschen der Biosensors umfassen.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform ist der Analyt mit einem Luminophor markiert und erfolgt die Detektion nur dann, wenn eine Komplexbildung zwischen Analyt und Fängermolekülen stattgefunden hat.

Bevorzugt ist der Luminophor ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Seltenerdmetallen oder Aktinidmetallen, insbesondere Europium, Terbium, Samarium; Halbleitern der Klassen II-VI, III-

V und IV, gegebenenfalls dotiert, insbesondere CdSe, CdS oder ZnS; und Erdalkalimetallfluoriden, insbesondere CaF<sub>2</sub>, und Mischungen derselben. Ganz besonders bevorzugt wird der Lumino-phor in Form von Nanokristallen, Beads oder eines Chelats verwendet.

Das Verfahren kann speziell zur Detektion einer Nukleinsäure, von Nukleinsäureanaloge, eines Proteins, Peptids, Haptens, Antikörpers oder eines Fragments desselben, einer Zuckerstruktur, eines Rezeptors oder eines Liganden durchgeführt werden.

In jedem Fall wird zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt ein wie zuvor beschriebener Biosensor verwendet.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt schematisch einen funktionellen Teilbereich eines erfindungsgemäßen Biosensors (1), welcher über einen CMOS-Prozess hergestellt wurde. Der optische Detektor, z.B. eine pn-Diode (2), ist überdeckt mit einem Isolator (z.B. Feldoxid) (4). Der Kratzschutz (3) ist im Bereich des optischen Detektors bzw. des Detektorfeldes entweder scharfkantig oder stufenweise heruntergeätzt, so dass die Fängermoleküle (z.B. DNA-Sonden) (6) in einem vertieften Bereich angeordnet sind. Die nicht der eigentlichen Detektion dienenden Kratzschutz-Oberflächen des Sensorchips können durch Aufbringung von z.B. Edelmetall oder hydrophoben/hydrophilen Materialien (5) modifiziert sein.

Fig. 2 zeigt, dass man auf dem Biosensor (1) erfindungsgemäß auch Detektoren bzw. Detektorfelder (2) vorsehen kann, die, wie im linken Teil der Darstellung angedeutet ist, nicht mit Fängermolekülen wie z.B. DNA-Sonden (6) bedruckt oder beschichtet sind. Das dient dazu, um Störsignale, wie sie z.B. durch die Eigenfluoreszenz der Systemkomponenten verursacht werden können, aus dem spezifischen Detektionssignal von der hybridisierten DNA (rechter Teil der Darstellung) herauszurechnen.

Fig. 3 zeigt, dass der erfindungsgemäße Biosensor (1) mit mehreren Photodioden (2) pro Nachweisfeld ausgestattet sein kann, wobei über jedem Detektor dieses Feldes dieselbe Art von Fängermolekülen immobilisiert ist. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit einer Mehrfachmessung für einen gegebenen Analyt/Fänger-Komplex, aus der eine statistische Abschät-

zung des spezifischen Messsignals abgeleitet werden kann. Beispielsweise wird hierdurch die Differenzierung zwischen unspezifischen und spezifischen Signalen ermöglicht.

Fig. 4 zeigt ein über mehrere Detektoren (2) ausgedehntes Nachweisfeld, mit Hilfe dessen Ungleichheiten bei der Immobilisierung der Fängermoleküle (6) auf der Oberflächen des erfindungsgemäßen Biosensors (1) ausgeglichen werden können.

#### Genaue Beschreibung der Erfindung

Gegenüber den vorbekannten Nachweissystemen, bei denen der lumineszenzgestützte Nachweis des Vorhandenseins eines Analyten (Liganden) in einer zu analysierenden Probe über die spezifische Bindung desselben an ein direkt oder indirekt an einer festen Phase immobilisiertes Fängermolekül und die nachfolgende Messung der vom Fänger/Analyt-Komplex emittierten Lichtintensität durch Verwendung komplexer Abbildungsoptiken wie CCD-Kameras erfolgt, basiert die vorliegende Erfindung darauf, dass diese aufwändigen Abbildungsoptiken durch integrierte Mittel für ein direktes Bildaufnahmeverfahren ersetzt werden.

Konkret betrifft die Erfindung somit einen optischen Biosensor in Form eines Mikrochip zur Detektion eines Fänger/Analyt-Komplexes mittels Lumineszenz, der Biosensor umfassend (a) einen Träger mit einer Oberfläche, auf der mindestens eine Art von Fängermolekül immobilisiert ist, (b) mindestens einen Detektor, der durch die Oberfläche hindurchtretendes Licht detektieren kann, und (c) wahlweise mindestens eine Anregungsquelle, die die Emission von Lumineszenzlicht induzieren kann, worin die Oberfläche die Messoberfläche des Detektors oder eine Oberfläche einer Schicht ist, die ohne zwischengeschalteten Wellenlängenfilter für Licht der Anregungsquelle d.h. der Anregungswellenlänge über dem Detektor angeordnet ist. Die Erfindung betrifft gleichermaßen ein Verfahren zum Nachweis eines Analyt/Fänger-Komplexes mittels zeitaufgelöster Lumineszenz unter Verwendung eines optischen Biosensors in Form eines Mikrochips, der Biosensor umfassend (a) einen Träger mit einer Oberfläche, auf der mindestens eine Art von Fängermolekül immobilisiert ist, (b) mindestens einen Detektor, der durch die Oberfläche hindurchtretendes Licht detektieren kann, und (c) wahlweise mindestens eine Anregungsquelle, die die Emission von Lumineszenzlicht induzieren kann, (vorzugsweise unter Verwendung des oben beschriebenen erfindungsgemäßen Biosensors), das Verfahren umfassend die Schritte (1) bis (3), worin in Schritt (1) für eine Anregungszeit  $T_1$  an die Fängermoleküle gebundene Luminophore und/oder Analyt/Fänger-Komplexe in einen angeregten Zustand überführt werden, in Schritt (2) für eine



Karenzzeit  $T_2$  im wesentlichen nicht angeregt wird und danach in Schritt (3) für eine Zeitspanne  $T_3$  emittiertes Lumineszenzlicht von dem mindestens einen Detektor detektiert und zum Nachweis des Komplexes ausgewertet wird.

Unter dem Begriff „Lumineszenz“ werden erfindungsgemäß sämtliche, durch eine Anregungsquelle hervorgerufenen Lichtemissionen (im weiteren Sinne auch die Aussendung von ultravioletter und infraroter Strahlung) von gasförmigen, flüssigen und festen Stoffen zusammengefasst, die nicht durch hohe Temperaturen, sondern durch vorangegangene Energieabsorption und Anregung verursacht werden. Die Lumineszenz zeigenden Stoffe werden Luminophore genannt. Auch wenn die vorliegende Erfindung z.T. unter Verwendung der Begriffe „Fluoreszenz“ und „Fluorophore“ näher erläutert wird, kennzeichnen diese Begriffe lediglich bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung und stellen somit keine Beschränkung derselben dar.

Wie dem Fachmann bekannt ist, kann eine Lumineszenz durch Bestrahlung mit Hilfe einer Anregungsquelle mit Licht (vorzugsweise kürzerwelliges Licht sowie Röntgenstrahlen, Photolumineszenz), mit Elektronen (Kathodolumineszenz), Ionen (Ionolumineszenz), Schallwellen (Sonolumineszenz) oder mit radioaktiven Stoffen (Radiolumineszenz), durch elektrische Felder (Elektrochemolumineszenz), durch chemische Reaktionen (Chemolumineszenz) oder mechanische Vorgänge (Tribolumineszenz) hervorgerufen werden. Demgegenüber handelt es sich bei der Thermolumineszenz um durch Erwärmung ausgelöste oder verstärkte Lumineszenz. Alle diese Prozesse unterliegen den allgemeinen Grundsätzen der Quantenmechanik und bewirken eine Anregung der Atome und Moleküle, die anschließend unter Emission von Licht, welches erfindungsgemäß detektiert wird, in den Grundzustand zurückkehren. Als „Eigenfluoreszenz“ wird eine Lumineszenz bezeichnet, die in einer Substanz oder einem Analyten ohne vorhergehende Markierung mit einem Luminophor angeregt werden kann.

Die Auswahl und ggf. unterschiedliche Ausführung geeigneter Anregungsquellen ist demnach davon abhängig, welche(r) Typ(en) der Lumineszenzerzeugung angewendet werden soll(en), und/oder den verwendeten Luminophoren. Folglich kann die Anregungsquelle z.B. in Form von Elektroden, Leuchtdioden, Ultraschallschwingern etc. vorgesehen sein. Die Anregungsquelle kann vorzugsweise ganz oder teilweise in den erfindungsgemäßen Biosensor integriert sein.

Seit langem ist bekannt, dass die Sensitivität und damit die untere Nachweisgrenze entsprechender Systeme durch eine den Werkstoffkomponenten inhärente Eigenfluoreszenz sowie durch systembedingte Lichtstreuungen eingeschränkt werden. Bestrebungen der Technik, das hierdurch verursachte Hintergrundrauschen zu minimieren bzw. ein optimiertes Verhältnis zwischen Signal und Rauschen zu erhalten, haben u.a. zur Technologie der zeitaufgelösten bzw. zeitverzögerten (time-resolved) Lumineszenz- bzw. Fluoreszenzmessung geführt, welche in verschiedenen Anwendungsgebieten bereits mit Erfolg angewendet wird.

Das allgemeine Prinzip der zeitaufgelösten Lumineszenz- und speziell Fluoreszenzmessung ist wie folgt: Im Falle der Anregung einer Mischung von Fluoreszenzverbindungen mit einem kurzen Lichtpuls bspw. aus einem Laser oder aus einer Blitzlichtlampe emittieren die angeregten Moleküle eine entweder kurz- oder langandauernde Fluoreszenz. Obgleich beide Typen der Fluoreszenzabnahme exponentiell verlaufen, klingt die kurzlebige Fluoreszenz innerhalb weniger Nanosekunden auf einen vernachlässigbaren Wert ab. Sofern Messungen während dieser kurzen Dauer nach erfolgter Anregung im wesentlichen unterbleiben, werden sämtliche Hintergrundsignale aus der kurzlebigen Fluoreszenz sowie sämtliche durch Streuung bedingten Strahlungsimpulse eliminiert, wodurch die lang andauernden Fluoreszenzsignale mit sehr hoher Sensitivität gemessen werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst daher Schritte (1) bis (3), worin in Schritt (1) für eine Anregungszeit  $T_1$  an die Fängermoleküle gebundene Luminophore und/oder die immobilisierten Analyt/Fänger-Komplexe selbst in einen angeregten Zustand überführt werden, in Schritt (2) für eine Karenzzeit  $T_2$  im wesentlichen nicht angeregt wird und danach in Schritt (3) für eine Zeitspanne  $T_3$  emittiertes Lumineszenzlicht von dem mindestens einen Detektor detektiert und zum Nachweis des Komplexes ausgewertet wird. Die während  $T_1$  und  $T_2$  detektierten Messwerte werden erfindungsgemäß bevorzugt nicht für die Auswertung berücksichtigt. Stärker bevorzugt erfolgt während dieser Zeiten keine Detektion.

Der Ausdruck „im wesentlichen nicht angeregt“ meint in diesem Zusammenhang, dass die Anregungsquelle während der Karenzzeit  $T_2$ , im Gegensatz zur Anregungszeit  $T_1$ , entweder vollständig abgeschaltet ist, was erfindungsgemäß bevorzugt ist, oder dem System weniger als 10 %, stärker bevorzugt weniger als 5 % und am meisten bevorzugt weniger als 2 % der Energie pro Zeiteinheit (s) zuführt, die während der Anregungszeit zugeführt wird. Am meisten bevorzugt ist die Anre-

gungsquelle während der Karenzzeit  $T_2$  und während der Messdauer  $T_3$  nicht aktiviert, d.h. führt dem System keine Energie zu.

Durch die Anwendung der zeitaufgelösten Lumineszenzmessung, die im Stand der Technik als für Biosensoren in Form von Mikrochips nicht anwendbar betrachtet wurde, wird es nun überraschend vorteilhafter Weise möglich, auf zwischen dem Ort der Signalentstehung (auf der Oberfläche gebundener Luminophor bzw. Eigenlumineszenz emittierender Komplex) und dem Detektionsort (Messoberfläche des bzw. der Detektoren) zwischengeschaltete Wellenlängenfilter zu verzichten. Dementsprechend kann das gesamte emittierte Lumineszenzlicht für die Messung bzw. den Nachweis genutzt werden, wodurch die Empfindlichkeit des Biosensors gegenüber dem entsprechenden Sensoren des Standes der Technik gesteigert werden kann. Hierzu trägt weiter die dichte Anordnung von Ort der Signalentstehung und Detektor bei (vorzugsweise kleiner oder gleich  $10\text{ }\mu\text{m}$ ).

Erfindungsgemäß kann entweder die Eigenlumineszenz von Komplexen (bspw. von Tyrosin enthaltenden Proteinen) oder die Lumineszenz von Luminophoren, die zuvor als Marker in die zu analysierenden Analyten eingeführt werden, genutzt werden. Letzteres ist bevorzugt. Die für diese Erfindung besonders geeigneten Luminophore sind solche, deren Halbwertszeit deutlich über  $5\text{ ns}$  liegt, so dass diese Luminophore nach dem Abklingen des sog. Fluoreszenzhintergrundes (s.o.) noch messbar sind. Am meisten bevorzugt sind Luminophore, deren Halbwertszeiten im  $\mu\text{s}$ - bis  $\text{ms}$ -Bereich, insbesondere im Bereich zwischen  $100\text{ }\mu\text{s}$  und  $2000\text{ }\mu\text{s}$  liegen. Dementsprechend werden die Messungen im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens im allgemeinen nach Verstreichen einer Zeitdauer von ca.  $5\text{ ns}$  nach erfolgter Anregung durchgeführt. Nach einer bevorzugten Ausführungsform liegt das Messfenster im  $\mu\text{s}$ - bis  $\text{ms}$ -Bereich, wobei der Bereich zwischen  $100\text{ }\mu\text{s}$  und  $2000\text{ }\mu\text{s}$  besonders bevorzugt ist.

Organische Luminophore weisen meist nur eine kurze Halbwertszeit des angeregten Zustandes auf. Dieser, Fluoreszenz i.e.S. genannte Effekt beruht auf der durch die Energie der Anregungsquelle verursachten Anhebung eines Elektrons auf eine höhere Vibrationsenergieebene, den sog. angeregten Singulettzustand. Dieser Zustand weist eine Stabilität von nur wenigen  $\text{ns}$  auf (z.B.  $2,6\text{ ns}$  für Tryptophan). Beim Rückfall des Elektrons aus dem angeregten Singulettzustand in den Grundzustand wird dabei die Anregungsenergie in Form von Licht frei. Die Emissionswellenlänge ist dabei in der Regel größer als diejenige der Anregungsquelle. Die Differenz zwischen Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge nennt man Stokes-Verschiebung. Bei einigen Lumi-

nophoren findet dagegen ein Übergang des angeregten Singulettzustandes in den sog. Triplettzustand statt. In diesem Falle kommt es zu einer Stabilisierung des angeregten Zustandes und zu einer Vergrößerung der Stokes-Verschiebung. Dieser Triplettzustand befindet sich in der Regel auf einem Energieniveau unmittelbar unter demjenigen des angeregten Singulettzustandes. Im Triplettzustand liegt keine Spinpaarung des Elektrons mit dem Grundzustand des Elektrons mehr vor. Somit handelt es sich bei dem Übergang vom Triplettzustand in den Grundzustand um einen quantenmechanisch verbotenen Übergang. Dadurch wird die Lebensdauer des angeregten Zustandes stabilisiert. Dieser Effekt wird Phosphoreszenz genannt und weist Halbwertszeiten bis zu 10 ms auf.

Klassische Luminophore mit langer Halbwertszeit sind z.B. Verbindungen von Seltenerdmetallen (SEM) oder Aktinidverbindungen, wobei letztere jedoch wegen ihrer Radioaktivität nur noch eine untergeordnete Rolle spielen. In der Biologie werden SE-Metallionen meist als Chelatkomplexe verwendet, da durch die Wahl eines geeigneten organischen Bindungspartners die Lumineszenzausbeute drastisch erhöht werden kann. Solche Verbindungen sind kommerziell als sogenannte „Microspheres“ mit einem Durchmesser von mehreren Hundert nm erhältlich (z.B. FluoSpheres® Europium Lumines-cent Microspheres, Molecular Probes). Besonders bevorzugte SE-Metalle sind Europium, Terbium und Samarium.

Weiterhin als Luminophore geeignet sind Nanokristalle von Halbleitern, da sie neben ihren Lumineszenzeigenschaften insbesondere eine relativ kleine Größe (wenige nm) und eine hohe Stabilität (kein Photobleaching) aufweisen. Die Halbwertszeit kann hier in Abhängigkeit von dem gewählten Halbleitermaterial und der Dotierung in einem weiten Bereich von mehreren Hundert ns bis hin in den Millisekundenbereich eingestellt werden. Entsprechende Nanopartikel können vom Fachmann leicht mit z.B. Silanen beschichtet und anschließend an organische Moleküle wie z.B. Nukleinsäuren oder Antikörper gekoppelt werden. Geeignete Halbleiter sind Halbleiter der Klassen II-VI (MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, HgS, HgSe, HgTe), III-V (GaAs, InGaAs, InP, InAs), und IV (Ge, Si). Derart beschaffene Halbleiterkristalle weisen Halbwertszeiten im Bereich von ca. 200 ns oder mehr auf. Nanokristalle der Klasse II-VI sind z.B. als sogenannte „Quantum Dots“<sup>®</sup> (Quantum Dot Corp., Kalifornien, USA) erhältlich. Das jeweilige Absorptionsspektrum von Nanokristallen innerhalb einer Klasse ist identisch, die jeweiligen Emissionsspektren unterscheiden sich jedoch in Abhängigkeit der gegebenen Partikelgröße, sodass bei der Verwendung von Filteroptiken mehrere paral-

lele Markierungen unter Verwendung einer Anregungswellenlänge gemessen werden können. Die Eigenschaften einiger Nanokristalle ergeben sich aus Tabelle 1.

Tabelle 1

Nanokristalle	Größe	Extinktion	Emission
CdSe-CdS	2,4 nm	350-450 nm	533 nm
CdSe-CdS	4,6 nm	350-450 nm	630 nm
ZnS $Mn^{2+}$ dotiert	1,5-3 nm	230-320 nm	550 – 650 nm

Weitere, im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Substanzen mit ausgeprägter Lumineszenz sind Kristalle aus Cadmiumselenid, Cadmiumsulfid oder Zinksulfid, die mit Mangan, Kupfer bzw. Silber dotiert sind. Die diesen Substanzen eigene Lumineszenz wird durch Störungen im Kristallgitter hervorgerufen. Durch die Auswahl verschiedener Metallionen zur Dotierung (Ag, Cu, Mn) können unterschiedliche Emissionsspektren erzeugt werden. Da die genannten Substanzen wasserunlöslich sind, werden sie erfindungsgemäß bevorzugt in Form sogenannter Mikropartikel („microparticles“) eingesetzt. Die Eigenschaften einiger Vertreter dieser Substanzgruppe werden anhand der obigen Tabelle 1 am Beispiel von  $Mn^{2+}$  dotiertem ZnS verdeutlicht.

Weitere erfindungsgemäß geeignete Luminophore sind Erdalkalihalogenide mit Gitterfehlstellen, wie sie z.B. durch Dotierungen (Fremdionen) oder radioaktive Strahlung hergestellt werden können. Beispielsweise zeigen Partikel aus Calciumfluorid (CaF) durch eine entsprechende Dotierung mit z.B. Europium eine deutliche Lumineszenz. Bei radioaktiv verursachten Gitterfehlern kann es z.B. im Falle von CaF auch zur Thermolumineszenz kommen, wobei bereits Temperaturen um 40 °C ausreichen, um eine Lumineszenz auszulösen.

Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Verwendung bevorzugt vorgesehenen fluoreszierenden Seltenerdmetallverbindungen bzw. Chelate wie insbesondere die Europium-Chelate wurden aufgrund bestimmter Vorteile gegenüber herkömmlichen Fluorophoren als Marker für die zeitaufgelöste Fluorometrie ausgewählt. Die fluoreszierenden Europium-Chelate weisen große „Stokes-Verschiebungen“ (ca. 290 nm) ohne eine Überlappung zwischen den Exzitations- und Emissionsspektren auf und sind durch ein sehr enges (10 nm Bandbreite) Emissionsspektrum bei ca. 615 nm gekennzeichnet. Ferner gestatten ihre langen Fluoreszenzhalbwertszeiten (600 – 1000  $\mu s$  für  $Eu^{3+}$  im Vergleich zu 5 – 20 ns für herkömmliche Fluorophore) die Anwendung zeit-

aufgelöster Fluoreszenzmessungen im Mikro- bis Millisekundenbereich, wodurch die oben erwähnten Hintergrundsignale wirksam reduziert werden können.

Tabelle 2

Metall-Ion (HWZ)	Zustand	Extinktion	Emission
Eu <sup>3+</sup> (600 $\mu$ s)	Microspheres	340-370 nm	610 nm
Tb <sup>3+</sup> (ca 1 ms)	NTA-Komplex	270 nm	545 nm
Pt <sup>2+</sup> (> 100 $\mu$ s)	Microspheres	390 nm	650 nm

NTA: 2-(Trifluoroacetyl)naphtalen, Molecular Probes

Die Verwendung von Europium-Chelaten als Marker im Rahmen einer zeitaufgelösten Fluorimetrie ist bereits seit längerem aus immunologischen Assays sowie aus Southern- und Western-Blot-Anwendungen bekannt. Die entsprechende Markierung des in einer zu untersuchenden Probe ggf. vorhandenen Biomoleküls (Analyt) kann anhand etablierter Protokolle entweder mit Eu<sup>3+</sup> oder einem Eu<sup>3+</sup>-Chelatbildner erfolgen (s. z.B. E.P. Diamandis und T.K. Christopoulos, „Europium chelate labels in time-resolved fluorescence immunoassays and DNA hybridization assays“, *Anal. Chem.* 62:1149A-1157A (1990)).

Nach einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Analyt alternativ biotinyliert sein und die Detektion unter Verwendung von Eu<sup>3+</sup> oder einem Eu<sup>3+</sup>-Chelatbildner erfolgen, welche an Streptavidin gekoppelt sind. Besonders bevorzugt hierbei ist die Verwendung sogenannter „Beads“, welche mit den entsprechend ausgewählten Seltenerdmetallverbindungen beladen sind und auf diese Weise eine sehr hohe Dichte an Lumineszenz emittierenden Molekülen gewährleisten. Aus empirischen Versuchen ist bekannt, dass die Nachweisgrenze derartig optimierter Fluorimetriesysteme bei ca. 1 bis 5 pg Protein oder DNA liegt.

Der erfindungsgemäße Biosensor umfasst einen Träger mit einer vorzugsweise planaren oder mit geeigneten Vertiefungen versehenen Oberfläche, auf der mindestens eine Art von Fängermolekülen, vorzugsweise mehrere Arten an Fängermolekülen immobilisiert ist bzw. sind. Die Immobilisierung erfolgt vorzugsweise über direkte oder indirekte (beispielsweise mittels Spacer) kovalente Bindung an die Oberfläche. Entsprechende Kupplungstechniken sind dem Fachmann bekannt. Die Fängermoleküle sind vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga, Haptenen, Proteinen, Peptiden, Antikörpern

oder deren Fragmenten, Zuckerstrukturen, Rezeptoren oder Liganden. Ganz besonders bevorzugt handelt es sich um DNS.

Der Träger des erfindungsgemäßen Biosensor ist grundsätzlich aus jedem geeigneten, zumindest in dem Bereich, in dem die Fängermoleküle immobilisiert sind, ausreichend transparenten Material. Geeignete Materialien schließen steife und flexible Materialien, beispielsweise Kunststofffolien, Polymere, Glas, steife Kunststoffe, Silizium, Siliziumnitrid, Siliziumoxid, Aluminium, Aluminiumoxid und andere aus der Halbleitertechnik bekannte Materialien, insbesondere direkte Halbleiter ein. Letztere sind üblicherweise bevorzugt. Der Träger ist üblicherweise planar, bspw. in Form eines Mikrochips ausgestaltet und kann Dimensionen von bis zu 5 cm, vorzugsweise 1 bis 5 cm Breite, bis zu 10 cm, vorzugsweise 2 bis 10 cm Länge und bis zu 0,5 cm, vorzugsweise 0,1 bis 0,5 cm Dicke aufweisen. Mit dem Ausdruck „Mikrochip“, wie er hierin verwendet wird, sind nicht zwingend die Eigenschaften eines aus der Elektronik bekannten Mikrochips impliziert. Grundsätzlich bezieht sich der Ausdruck zunächst auf die planare Bauweise wie auch die Dimensionierung, die sich deutlich von herkömmlichen Optiken unterscheidet. Wesentlich ist außerdem die Bereitstellung einer (bevorzugt planaren) Oberfläche, auf der die Fängermoleküle immobilisiert werden können. Die Verwendung eines „Mikrochip“ im herkömmlichen Sinne ist jedoch bevorzugt. Ein solcher Mikrochip ist üblicherweise eine monolithische, d.h. aus einem Stück gefertigte Kombination verschiedener Halbleitermaterialien wie z.B. Silizium, Siliziumdioxid, Siliziumnitrid, Aluminium, Aluminiumoxid usw.

Beispielsweise kann auch die aus der EP-A-0 881 490 bekannte Messeinrichtung zur Messung bestimmter physiologischer wie auch morphologischer Parameter mindestens einer zu untersuchenden lebenden Zelle kann zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens nach entsprechender Modifikation verwendet werden. Die beschriebene Einrichtung weist bereits eine Vielzahl von Sensoren bzw. Detektoren auf, die integraler Bestandteil einer Trägereinrichtung sind, auf welcher das zu untersuchende Material immobilisiert ist.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform kann der Träger im wesentlichen aus einem Halbleitermaterial mit einer integrierten, vorzugsweise mehrere Detektoren umfassenden optischen Detektorschicht bestehen, wobei als Detektoren vorzugsweise Photodioden eingearbeitet sind. Diese Schicht kann monolithisch in den Träger (Mikrochip im engeren elektronischen Sinne) eingearbei-

tet sein. Alternativ kann sie auf die Unterseite des Trägers aufgeklebt werden, wobei die Fängermoleküle auf der Oberseite desselben immobilisiert sind.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Signalverarbeitung zumindest teilweise innerhalb des Biosensors. Nach einem Aspekt der vorliegenden Erfindung kann die zeitaufgelöste Fluoreszenz beispielsweise direkt auf dem Mikrochip mit analogen Schaltungen ausgewertet werden, indem man nach Abschalten der Anregungsquelle z.B. jede Nanosekunde einen Wert aufnimmt, der dann z.B. auch mit einem Referenzwert einer zuvor durchgeführten Messung, welcher ebenfalls auf dem Mikrochip gespeichert wurde, verglichen wird. Darüber hinaus wird auf diese Weise ermöglicht, dass man unspezifische Störsignale wie z.B. die Eigenfluoreszenz von gegebenenfalls anwesenden Systemkomponenten herausrechnen kann (s. auch Fig. 2). Geht man davon aus, dass man mittlerweile auch bis in den GHz Bereich ( $< 1$  ns) auflösen kann, so kann die Eigenfluoreszenz von der künstlichen Fluoreszenz unterschieden werden.

Sofern die Trägeroberfläche das Design einer Microarray-Anordnung aufweist, bei der eine Vielzahl von Nachweisfeldern auszuwerten sind, kann die Detektion der Lumineszenzsignale sequenziell erfolgen, indem z.B. ganze Zeilen oder Spalten der Oberfläche bzw. Teile derselben nacheinander angeregt und detektiert werden (Multiplexanwendung).

Beispielsweise können die elektronischen Ausgangssignale der Detektoren mittels geeigneter Schaltungseinrichtungen nach einer Analog-Digitalumsetzung einer externen Auswerteeinrichtung zugeführt werden. Als erfindungsgemäß geeignete optische Detektoren bzw. Sensoren kommen neben der Photodiode (pn, p-i-n, avalanche) CCD-Sensoren oder Photoleiter in Betracht, die vorzugsweise in Form einer Zeilen- oder Arrayanordnung (= Raster) in das Halbleitersubstrat der Biosensor monolithisch eingearbeitet sind. Photodioden können vorteilhaft im Rahmen einer zeitaufgelösten Lumineszenzmessung eingesetzt werden, da sie im Vergleich zu Photomultipliern eine geringe Detektionsfläche oder Messoberfläche aufweisen.

Nach einem besonders bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Anregungsquelle integraler Bestandteil des Biosensors (bspw. in Form von Elektroden) und wird am meisten bevorzugt durch den Detektor selbst bereitgestellt. Die Wahl einer pn-Diode aus direktem Halbleitermaterial ermöglicht folgendes: Im ersten Fall bedeutet die Aktivierung die Anlegung einer Spannung, wodurch ein Lichtsignal (pn-Diode wird als LED benutzt) ausgesendet wird, welches je



nach Art und Beschaffenheit der pn-Diode in einem bestimmten Emissionswellenlängenband liegt und die Anregung eines im Bereich dieser pn-Diode gebundenen Analyten bewirkt. Nach Deaktivierung der pn-Diode (pn-Diode wird als Photodiode benutzt) und nach Verstreichen einer gewissen Karenzzeit wird sie dann noch einmal aktiviert, um die gewünschte(n) Messung(en) durchzuführen.

Dadurch, dass die Anregungsstrahlung in der zuvor beschriebenen Ausführungsform über dieselbe Komponente eingekoppelt wird, mit der auch die Lumineszenzstrahlung aufgefangen wird, kann erreicht werden, dass selektiv ein sehr kleiner Bereich der Sensoroberfläche bzw. des Nachweisfeldes bestrahlt wird und von diesem Bereich ausgehende Lumineszenzstrahlung ausgewertet wird. Durch diese Vorgehensweise ist das untersuchte Nachweisfeld sehr genau abzubilden und eine Störung der Messung durch Lumineszenz von außerhalb des untersuchten Bereichs kann verhindert werden.

Selbstverständlich können die Detektoren zusätzlich in Gruppen angeordnet sein, wodurch einzelne Detektionsfelder geschaffen werden, deren Eingangssignale ein zuverlässigeres Ergebnis gewährleisten als es bei einer Einzelbelegung pro Nachweisfeld der Fall wäre (siehe Fig.3). Durch eine Mehrfachbelegung pro Nachweisfeld kann auch eine messtechnische Zentrierung des Analyten-Bindungsereignisses gewährleistet werden, was im Wege der Signalaufbereitung zu einer deutlichen Sensitivitätssteigerung beitragen kann.

Die Herstellung eines erfindungsgemäßen Biosensors kann unter Anwendung des an sich bekannten CMOS (complementary metal-oxide semiconductor)-Verfahrens erfolgen, weshalb alle Schaltungsbibliotheken für die Integration von Signalkonditionierung und Auswertung ohne Modifikationen verfügbar sind und im Rahmen der vorliegenden Erfindung implementiert werden können. Eine ausführliche Darstellung findet sich beispielsweise in der WO 99/27 140. Erfindungsgemäß ebenfalls geeignete Herstellungsverfahren sind z.B. NMOS-Prozesse oder Bipolar-Prozesse. Ferner besteht die insbesondere nach Kostengesichtspunkten interessante Möglichkeit der Herstellung eines erfindungsgemäßen Biosensors auf der Basis von organischen Halbleitern (s. z.B. EP-A-1 085 319).

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die einzelnen Nachweisfelder voneinander in der Weise getrennt, dass im wesentlichen keine Lichtemission eines Feldes von dem oder

den Detektoren eines anderen Feldes empfangen werden kann. So können die einzelnen Nachweisfelder in Vertiefungen angeordnet sein, wie sie zum Beispiel von üblichen Mikrotiterplatten bekannt sind. Bevorzugt sind erfindungsgemäß muldenartige Vertiefungen und Vertiefungen mit Boden, deren seitlichen Wandungen im wesentlichen senkrecht zur Oberfläche des Sensorchips angeordnet sind. Die jeweiligen Abmessungen einer solchen Vertiefung kann der Fachmann in Kenntnis des Anwendungsbereichs frei wählen, solange sich der bzw. die Luminophoren des zu erwartenden Analyt/Fänger-Komplexes innerhalb der Vertiefung, bevorzugt auf deren Boden, befinden und im wesentlichen kein Emissionslicht in benachbarte Vertiefungen eindringen kann.

Bei einer besonders bevorzugte Vertiefung ist deren Boden um mindestens 100 nm, vorzugsweise 100 nm bis 10 µm, stärker bevorzugt 100 bis 5000 nm, in die Oberfläche des erfindungsgemäßen Biosensors eingesenkt. Der gleiche Effekt kann alternativ erzielt werden, indem auf der im wesentlichen planaren Oberfläche senkrecht nach oben gerichtete Trennmittel angeordnet sind, deren Abmessungen vom Fachmann in Kenntnis des gewünschten Anwendungsbereiches und der räumlichen Abmessung eines antizipierten Fänger/Analyt-Komplexes leicht ausgewählt werden können. Die Anbringung entsprechend geeigneter Trennmittel kann beispielsweise durch anodisches Bonden oder durch sogenannte Flip-Chip-Verfahren erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführung sind auf dem Biosensor in Form eines Mikrochips Kanäle aufgebracht. Die Kanäle können z.B. Reihen von Nachweisfeldern versorgen, auf denen die Arrays der Fängermoleküle gebunden sind. So ließen sich z.B. Kalibrationsmessungen durchführen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann eine Parallelmessung von identischen Arrays bspw. an parallelen Proben durchgeführt werden, um so die Kosten pro Analyse drastisch zu senken. Dazu wird der Mikrochip durch Mikrokanäle in beispielsweise 8 identische Kompartimente unterteilt.

Für den Fachmann ist offensichtlich, dass die Wahl des Trägermaterials, der Oberfläche und des bzw. der Detektor(en) von der zu detektierenden Emissionswellenlänge des Luminophors abhängt. Grundsätzlich ist zu sagen, dass der Detektor aufgrund des sogenannten „Halbleiterbandgaps“ je nach Materialwahl (z.B. Silizium oder Germanium) unterschiedliche Empfindlichkeiten bezüglich der Wellenlänge hat. Im bevorzugten Falle der Verwendung einer Silizium-Photodiode wird daher ein Empfindlichkeitsbereich geschaffen, der vom infraroten bis in das ultraviolette Wellenspektrum reicht, wobei die Empfindlichkeit zwischen diesen Bereichen am größten ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann der erfindungsgemäße Biosensor weiterhin zusätzlich eines oder mehrere Elemente aus der Gruppe, bestehend aus einer Steuereinheit, mindestens einem Verstärker, einem oder mehreren Signalwandlern, einer oder mehreren Speichereinheiten, einem oder mehreren Filtern, einer Optik, Lichtleitern und einer oder mehreren Schutzschichten umfassen; dies mit der Maßgabe, dass zwischen dem oder den Detektoren und der Oberfläche des Trägers, auf der die Fängermoleküle immobilisiert sind, kein Wellenlängenfilter für Licht der Anregungsquelle bzw. dessen Wellenlänge angeordnet oder zwischengeschaltet ist. Am meisten bevorzugt ist die Ausführungsform, in der die Fängermoleküle auf der Messoberfläche des Detektors (bspw. oberste Schicht einer pn-Diode) immobilisiert sind.

Wenn man als Träger und Oberfläche für die Fängermoleküle und die Ausbildung der Detektoren ein monolithisch integrierbares Halbleitermaterial verwendet, lässt sich auch eine monolithisch integrierte Schaltung auf dem selben Substrat herstellen, wodurch in unmittelbarer Nähe zum Untersuchungsobjekt (Fänger/Analyt-Komplex) eine Vorverarbeitung der elektronischen Detektorausgangssignale erfolgen kann. Somit handelt es sich bei dieser bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung um einen „intelligenten“ Biosensor, der wesentlich mehr leistet, als rein passive Sensoren. Beispielsweise können die Ausgangssignale der elektrooptischen Detektoren durch eine mitintegrierte Schaltung so aufbereitet werden, dass sie über Ausgangsschaltungen und Anschlusskontakte relativ problemlos nach außen geführt und dort verarbeitet, d.h. ausgewertet werden können. Ferner kann die Vorverarbeitung aus der Digitalisierung der analogen Detektorsignale und ihre Umwandlung in einen geeigneten Datenstrom bestehen.

Des weiteren kann das Signal-Rausch-Verhältnis durch die in dem erfindungsgemäßen Biosensor verwirklichten Nähe des Detektors zum Ort der Signalverarbeitung aufgrund kurzer Signalwege sehr stark verbessert werden. Darüber hinaus sind auch weitere Verarbeitungsschritte möglich, mit denen z.B. die Datenmenge reduziert werden kann oder die der externen Verarbeitung und Darstellung dienen. Damit ist es möglich, dass die verbleibende Auswertung der optischen Signale und ihre Darstellung über einen Personal Computer (PC) erfolgen kann. Ferner kann die erfindungsgemäße Biosensor so ausgestaltet sein, dass die vorzugsweise verdichteten bzw. aufbereiteten Daten über Infrarot- oder Funkverbindung an entsprechend ausgestattete Empfangsstationen übermittelt werden können.

Die Steuerung der zugehörigen Einrichtungen auf dem Substrat kann über Steuersignale aus einer Steuereinrichtung erfolgen, die vorzugsweise ebenfalls ganz oder teilweise auf dem Substrat ausgebildet sein kann oder extern angeschlossen wird.

Die mögliche Auswertung der optischen/elektrischen Signale im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens über einen handelsüblichen Computer hat den weiteren Vorteil, dass über geeignete Programme eine weitgehende Automatisierung der Datenauswertung sowie -speicherung möglich ist, so dass man im Rahmen der Datenanalyse durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Biosensor keinerlei Einschränkungen gegenüber mit Hilfe herkömmlicher externer Abbildungsoptiken generierter Daten unterliegt.

Das direkte Erfassen der Lumineszenzen auf dem erfindungsgemäßen Biosensor wird dadurch realisiert, dass sich die für einen spezifischen Nachweis erforderlichen Fängermoleküle – direkt oder z.B. über einen üblichen Abstandshalter (Spacer) bzw. eine Kopplungsmatrix – auf einer Oberfläche befinden, die entweder die Messoberfläche des Detektors ist oder die Oberfläche einer Schicht ist, die unmittelbar über dieser Messoberfläche angeordnet ist, ohne zwischengeschalteten Wellenlängenfilter. Diese Anordnung hilft, den Abstand zwischen dem Ort der Signalentstehung (Emission von Lumineszenzlicht) und dem Ort der Detektion zu verringern und damit die Ausbeute an Lumineszenzlicht zu maximieren.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform wird der optische Detektor in Form mindestens einer Photodiode bereitgestellt, wobei die Gegenwart einer Vielzahl dieser Photodioden u.a. zum parallelen bzw. sequentiellen Nachweis mehrerer unterschiedlicher Analyten (Liganden) besonders bevorzugt ist. Aber auch bei Verwendung nur einer Art von Luminophor bietet die Mehrfachanordnung den Vorteil, dass man durch mehrere Detektoren pro Nachweisfeld Profile aufnehmen kann, mit deren Hilfe sich die ortsspezifische Zuordnung eines Bindungsereignisses von Fängermolekül und Analyt im Wege der Zentrierung verbessern lässt. Im Rahmen dieser speziell auf die als solche bekannten Mikroarray-Anordnungen gerichteten Ausführungsformen können die einzelnen Photodioden vorteilhafterweise zu definierten Gruppen bzw. Messfeldern zusammengefasst sein, wodurch die Sensitivität der nachfolgenden Lumineszenzmessung sowie die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der hierdurch erhaltenen Messdaten signifikant erhöht werden.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform besteht die ggf. freigelegte Oberfläche (Biosensor ansonsten z.B. von einer Schutzschicht bedeckt) einer jeden Photodiode (als Detektor und ggf. gleichzeitig als Anregungsquelle) aus  $\text{SiO}_2$  oder  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Weiterhin können bestimmte Verfahrensparameter der Fänger/Analyt-Bindung und der Detektion durch Wahl des Oberflächenmaterials für den Biosensor in Form eines Mikrochip positiv beeinflusst werden. Beispielsweise kann an manchen Stellen  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , an anderen dagegen  $\text{SiO}_2$  (oder z.B.  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) oder ein Edelmetall aufgebracht sein, wodurch auf dem Sensor oder sogar in einzelnen Nachweisfeldern für die Biomoleküle oder Spacer bevorzugte Bereiche mit z.B. eher hydrophoben bzw. eher hydrophilen Eigenschaften bereitgestellt werden können, um das Aufbringen von z.B. DNA als Fängermolekül ortsgerichtet zu fördern oder zu verhindern. Des weiteren können durch Aufbringen von ansteuerbaren Edelmetallelektroden erfindungsgemäß bevorzugte Biosensoren geschaffen werden, bei denen z.B. durch Anlegen ggf. pro Nachweisfeld unterschiedlicher Spannungen Hybridisierungsereignisse beschleunigt oder eine Fluoreszenz ausgehend von elektrisch anregbaren Luminophor (Elektrochemolumineszenz) ausgelöst werden kann.

Die Anregungsquelle, die z.B. in Form einer oder mehrerer Weißlichtlampen, LED's, (Halbleiter) Laser, UV-Röhren, sowie durch Piezoelemente (Ultraschall) bzw. durch Lichtenergie abgebende Gase und/oder Flüssigkeiten (chemische Anregung) oder durch Elektroden bereitgestellt werden kann, sollte ausreichend leistungsstark und vorzugsweise mit hoher Frequenz repetierbar sein. Letztere Eigenschaft ist dann gegeben, wenn die Lichtquelle sowohl kurzzeitig aktiviert als auch gelöscht werden kann. Im Falle der Verwendung einer optischen Anregungsquelle sollte diese so abschaltbar sein, dass nach dem Abschalten im wesentlichen keine weiteren Photonen (wie z.B. durch Nachglühen) auf den Detektor treffen, d.h. dem System keine Energie im oben genannten Sinne zugeführt wird. Dies kann erforderlichenfalls beispielsweise durch Verwendung von mechanischen Verschlussblenden (engl. „shutter“), sowie durch Auswahl von LED's oder Lasern als optische Anregungsquelle gewährleistet werden.

Vorzugsweise ist die Anregungsquelle mit dem Biosensor und den Detektoren optisch und mechanisch so gekoppelt, dass ein Strahlungsfeld in Richtung der letzteren erzeugt wird, wobei der räumliche Abstand der Anregungsquelle zur Ebene der Signalentstehung, d.h. der Oberfläche, auf der die Fängermoleküle immobilisiert sind, möglichst klein ist. Der Abstand muss jedoch ausreichend sein, damit die für den bestimmungsgemäßen Einsatz erforderlichen Reaktionen zwischen Ligand/Analyt und Fängermolekül nicht beeinträchtigt werden. Dabei kann es zweckmäßig sein,

dass die Anregungsquelle – entsprechend der Vielzahl vorgesehener Nachweisfelder auf dem Träger – aus einer Vielzahl von punktförmigen Strahlungsquellen besteht, die bspw. mittels einer Steuereinrichtung einzeln oder in Gruppen aktivierbar sind. Hier ist die gleichzeitige Verwendung einer pn-Diode als Anregungsquelle (LED) und Detektor (Photodiode) besonders bevorzugt. Die Bestrahlung kann direkt, d.h. ohne eine zwischengeschaltete Optik erfolgen, wenn der von der Anregungsquelle ausgesandte Lichtstrahl bereits ausreichend stark fokussiert ist, um die insbesondere im Rahmen der Verwendung sogenannter Mikroarrays sehr kleinen Nachweisfelder zu gewährleisten. Alternativ kann der Strahlungsgang aus der Anregungsquelle aber auch durch Verwendung geeigneter Linsen fokussiert werden, sofern dies z.B. durch eine sehr enge Belegung von Fängermolekülen auf der Sensoroberfläche angezeigt ist. Dem Fachmann ist klar, dass hierdurch ein weiteres Mittel zur Verringerung unspezifischer Störsignale wie z.B. Eigenfluoreszenz bereitgestellt wird.

Die Anordnung der punktförmigen Strahlungsquellen, die z.B. aus gebündelten Lichtleiterfasern oder aus miniaturisierten LED (Light Emitting Diode) bestehen oder auf andere Weise realisiert sind, ist zweckmäßigerweise zeilen- oder feldförmig und damit der Anordnung der Fängermoleküle auf der Sensoroberfläche funktional angepasst. Für die Verwendung im Rahmen von Analysen unter Einsatz unterschiedlicher SE-Metallchelate kann es vorteilhaft sein, dass die Anregungsquellen hinsichtlich der von ihnen abzugebenen Wellenlänge durchstimmbar sind oder Anregungsquellen für unterschiedliche Wellenlängen vorhanden sind. Des weiteren kann es für bestimmte Anwendungszwecke vorteilhaft sein, wenn die Anregungsquelle frequenzmoduliert wird. Hierbei wird intensitätsmoduliertes Anregungslicht eingesetzt, wobei die Modulation bei der Messung von Halbwertzeiten im Nanosekunden-Bereich mit mehreren MHz erfolgt. Das dem Fachmann unter der Bezeichnung FLIM (engl. „Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy“) bekannte Verfahren ist daher im Rahmen einer weiteren erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform eingeschlossen. Den vorhergehenden Ausführungen entspricht, dass auf der Detektorseite unterschiedliche oder durchstimmbare Detektoren für die Erfassung der aus einem Fänger/Analyt-Komplex emittierten Lichtenergie vorhanden sein können. Sofern es sich hierbei um Photodioden handelt, werden für den erfindungsgemäßen Biosensor wellenlängenspezifische Photoelemente verwendet.

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind auch Biosensoren mit herkömmlichen Photodioden geeignet die mit aufgelegten, aufgebracht, aufgedampften oder integrierten

Wellenlängenfiltern ausgestattet sind. So ist z.B. bekannt, dass Siliziumnitrid im Gegensatz zu Siliziumoxid UV-Licht nicht durchläßt, und dass Polysilizium UV-Strahlung absorbiert. Daher kann auf die Gateoxidschicht im Rahmen des üblichen CMOS-Prozesses Nitrid oder Polysilizium deponiert werden, wodurch auf der Photodiode entsprechende Filter geschaffen werden. So hat z.B. NADH (Nicotinamid Adenine Dinucleotid) eine Anregungswellenlänge von 350 nm und eine Emissionswellenlänge von 450 nm. Durch Aufbringung eines Filters, der 350 nm ausfiltert, kann daher die Sensitivität erhöht werden. Für das erfindungsgemäße Verfahren kann dieser Effekt genutzt werden, um bei paralleler Verwendung von z.B. zwei unterschiedlichen Luminophoren, von denen beispielsweise nur einer Licht im UV-Bereich emittiert, eine differentielle Detektion zu ermöglichen, da die hierfür vorgesehenen Detektoren UV-sensitiv ausgestaltet sind oder nicht. Ferner bietet dieser Effekt die Möglichkeit, gegebenenfalls störende Eigenfluoreszenzen anwesender Materialien mit bekannter Emissionswellenlänge durch Bereitstellung entsprechender Filter aus dem Messverfahren herauszunehmen. Ein Beispiel hierfür ist die parallele Verwendung von Europium-Chelaten (Emission bei ca. 620 nm) und mit Kupfer dotiertem Zinksulfid (Emission bei ca. 525 nm), die durch hinreichend voneinander verschiedenen Emissionswellenlängenbereichen eine Zweifarbdetektion ermöglichen, z.B. innerhalb eines Bereichs eines Nachweissfeldes, indem z.B. die eine Hälfte der Detektoren eines Nachweissfeldes mit einem Tiefpassfilter und die andere Hälfte der Detektoren des gleichen Feldes mit einem Hochpassfilter ausgestattet ist. Am meisten bevorzugt wird zur Verbesserung der Empfindlichkeit jedoch auf die Verwendung von Wellenlängenfiltern verzichtet.

Zusätzlich oder alternativ können unterschiedliche Luminophoren parallel eingesetzt werden, sofern ihre physikalischen bzw. optischen Eigenschaften hinreichend voneinander abweichen. Beispielsweise werden erfindungsgemäß die unterschiedlichen Anregungswellenlängen zweier zu verwendender Luminophore A und B und/oder deren unterschiedlichen Halbwertszeiten genutzt. Dies kann z.B. durch Bereitstellung von zwei unterschiedlich dotierten Nanokristallen erfolgen. Im letztgenannten Fall unterschiedlicher Halbwertszeiten können die Emissionen in zwei nacheinander liegenden Messzeiten  $T_3$  und  $T_4$  erfasst werden.

Die Fänger/Analyt-Komplex spezifische Detektion bzw. der Nachweis und ggf. die Quantifizierung der Komplexe erfordert die Fixierung vorzugsweise Immobilisierung mindestens einer Art, vorzugsweise mehrerer Arten von Fängermolekülen auf der Oberfläche des Trägers des Biosensors. Diese Immobilisierung kann sie nach einer bevorzugten Ausführungsform mit Hilfe einer

kopplungsfähigen Substanz erfolgen, die auf die Oberfläche aufgeschichtet ist. Typischerweise werden hierzu die Biosensor -Oberflächen aus Metall- bzw. Halbmetalloxiden, wie z.B. Aluminiumoxid, Quarzglas, Glas, in eine Lösung von bifunktionellen Molekülen (sog. "Linker"), die beispielsweise eine Halogensilan- (z.B. Chlorsilan-) oder Alkoxysilangruppe zur Kopplung an die Trägeroberfläche aufweisen, getaucht, so dass sich eine sich selbst organisierende Monoschicht (SAM) bildet, durch welche die kovalente Bindung zwischen Sensoroberfläche und Rezeptor erzeugt wird. Beispielsweise kann mit Glycidyltriethoxysilan beschichtet werden, was z.B. durch Eintauchen in eine Lösung von 1% Silan in Toluol, langsames Herausziehen und Immobilisieren durch „Backen“ bei 120° C erfolgen kann. Eine auf diese Weise geschaffene Beschichtung weist im Allgemeinen eine Dicke von wenigen Ångström aus. Die Kopplung zwischen Linker und Fängermoleküle(n) erfolgt über eine geeignete weitere funktionelle Gruppe, beispielsweise eine Amino- oder Epoxygruppe. Geeignete bifunktionelle Linker für die Kopplung einer Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptor-Molekülen, insbesondere auch biologischen Ursprungs, an eine Vielzahl von Trägeroberflächen sind dem Fachmann gut bekannt.

Sofern es sich bei den zu detektierenden Biomolekülen um Nukleinsäuren handelt, können anschließend geeignete DNA-Sonden als Fängermoleküle mittels gängiger Druckgeräte aufgebracht und immobilisiert werden.

Auf derart hergestellten Biosensoren können nun unter Anwendung etablierter Verfahren Hybridisierungen mit z.B. biotinylierter DNA durchgeführt werden. Diese kann z.B. mittels PCR und den Einbau von Biotin-dUTP erzeugt werden. Beim Hybridisieren bindet die biotinylierte DNA an den auf dem Biosensor im jeweiligen Nachweisfeld immobilisierten komplementären Strang (sofern vorhanden). Positive Hybridisierungsereignisse können dann durch Zugabe von Konjugaten aus Streptavidin /Avidin und Luminophor nachgewiesen werden. Als Luminophorkonjugate sind erfindungsgemäß besonders geeignet: Europium-, Terbium- und Samarium-Chelate, Microspheres („Beads“), die z.B. über Avidin-/Streptavidin mit Eu-, Sm-, Tb-Chelaten beladen sind. Besonders geeignet sind hierbei lumineszierende Microspheres, wie z.B. FluoSpheres Europium (Molecular Probes F-20883), da sie in der Lage sind, eine große Zahl von Fluorochromen mit einem Bindungsereignis zu immobilisieren. Erfindungsgemäß ferner geeignet sind Nanokristalle, wie sie z.B. von der Quantum Dot Corp. unter der Bezeichnung „Quantum-Dots®“ angeboten werden. Nach dem Waschen zum Entfernen nicht gebundener markierter Analyten bzw. frei flottierender Lumi-



neszenzfarbstoffe erfolgt die Messung der Bindung über eine geeignete Anregung und die Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz bei ausgeschalteter Anregungslichtquelle.

Erfindungsgemäß werden die Zeitdauer der Anregung (Anregungszeit) mit  $T_1$ , die Zeitdauer zwischen Anregung und Messung (Karenzzeit) mit  $T_2$ , und die Zeitdauer der Messung (Messdauer) mit  $T_3$  und ggf. eine zweite Messdauer mit  $T_4$  bezeichnet. Bevorzugt beträgt die Zeit  $T_1$  1 Nanosekunde bis 2 Millisekunden, die Zeit  $T_2$  1 Nanosekunde bis 500 Mikrosekunden, bevorzugt 1 bis 5 ns, und die Zeit  $T_3$  5 Nanosekunden bis 10 Millisekunden, bevorzugt 5 ns bis 2 ms.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zusätzlich einen vorgelagerten Schritt des In-Kontaktbringens der Fängermoleküle mit einer Probe, von der man annimmt, dass sie einen Liganden der Fängermoleküle enthält, und ggf. Waschen des Biosensors umfassen. Bevorzugt ist der Analyt mit einem Luminophor markiert und erfolgt die Detektion nur dann, wenn eine Komplexbildung zwischen Analyt und Fänger stattgefunden hat.

Die Signale des Detektors bzw. der Detektoren werden durch eine Aufnahmeeinheit aufgenommen. Eine Aufnahmeeinheit besitzt einen sehr schnellen Konverter zur Umwandlung analoger Detektorsignale in digitale Werte, die gespeichert werden. Eine Auswertung der digitalen Werte wird vorzugsweise in Echtzeit vorgenommen, kann jedoch auch zeitlich verzögert erfolgen. Zur Auswertung der digitalen Werte kann ein gewöhnlicher Mikroprozessor verwendet werden. Diese Auswertung erfolgt nur während der Messdauer  $T_3$  und ggf.  $T_4$ .

Für den Fall, dass das Lumineszenzsignal für eine eindeutige Detektion zu schwach ist, kann im Rahmen einer bevorzugten Ausführungsform der Detektion eine Erhöhung der Nachweisensitivität über eine Integration mehrerer Einzelmessungen erreicht werden. Dabei erfolgt eine identische Messung mehrfach (die Schritte (1) bis (3) oder (1) bis (4) werden mehrfach durchlaufen) und die Messergebnisse werden aufaddiert. Dies kann sowohl direkt auf dem Sensorchip als auch nach der Messung über geeignete Software erfolgen.

Eine Einzelmessung, umfassend die Schritte (1) bis (3) sieht beispielsweise folgendermaßen aus: Während der Anregungszeit  $T_1$  ist die Photodiode als Detektor in einem gegenüber dem Anregungszustand unempfindlichen Modus. Die Anregungsquelle ist während dieser Zeit aktiv. Während der Zeitdauer  $T_2$  sind sowohl die Anregungsquelle als auch die Photodiode inaktiv. Während

dieser Zeit kann die Hintergrundlumineszenz abklingen. Während der Zeitdauer  $T_3$  ist die Photodiode aktiv und detektiert ein bis mehrere einfallende Photonen der Luminophore. Durch Rücksetzen der Photodiode in den inaktiven Modus kann der Vorgang der Detektion wiederholt werden. Die jeweiligen Zeitintervalle können beispielsweise mit 2 ms ( $T_1$ ), 5 ns ( $T_2$ ), und 2 ms ( $T_3$ ) ausgewählt werden. Das Zeitintervall  $T_3$  kann bei entsprechender Signalstärke auch deutlich kleiner als die Halbwertszeit des angeregten Zustandes des bzw. der eingesetzten Luminophore sein.

Nach einer besonders bevorzugten Ausführungsform der repetitiven Anregung werden die im Zeitintervall  $T_3$  erhaltenen Detektorwerte, gegebenenfalls nach Digitalisierung und weiterer elektronischer Bearbeitung, in Speicherzellen abgelegt, die einzelnen Zeitintervallen zugeordnet sind. Ein derartiger Speicher besitzt beispielsweise 100 oder mehr Speicherzellen, die aufeinanderfolgenden Zeitintervallen zugeordnet sind. Ein solches Zeitintervall liegt vorzugsweise im Bereich von 1 bis 100 Nanosekunden.

Besonders bevorzugt kann das vom Detektor erhaltene Signal auch bezüglich der Signalintensität analysiert und festgestellt werden, von wievielen Einzelmolekülen (Anzahl der Fänger/Analyt-Komplexe) das Signal ausgegangen ist, wodurch nicht nur eine qualitative sondern auch eine quantitative Analyse ermöglicht wird. In der Speicherzelle wird nunmehr das der Luminophorzahl entsprechende Vielfache des Einheitswertes abgespeichert.

Der zuvor beschriebene Speicherprozess erfolgt für jede Einzelmessung erneut, wobei eine Summation vorgenommen wird, sofern eine wiederholte Anregung gewünscht ist, d.h. die Schritte (1) bis (3) mehrfach durchlaufen werden. Der nach einer Messung in einer bestimmten Speicherzelle abgespeicherte Einheitswert, oder ggf. ein Vielfaches davon, wird dabei zu dem in der Zelle bereits vorhandenen Wert addiert. Die Summenkurve, die auf diese Weise mit den Messungen für ein bestimmtes Nachweisfeld erhalten wird, kann ausgewertet werden, um zu ermitteln, welche und/oder wieviele lumineszierenden Analyten im Nachweisfeld gebunden sind. Auf die Summenkurven können prinzipiell solche Auswerteverfahren angewandt werden, wie sie auch für Signalkurven eingesetzt werden, die mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Analyten erhalten wurden. Eine absolute Erfassung der Lumineszenzereignisse auf wenige Picosekunden genau erlaubt eine globale Analyse der Photonenstatistik. Es können charakteristische Häufungen oder Pausen in der globalen Photonenverteilung erkannt und ermittelt werden. Es wird dadurch die Messung der Triplettedauer eines Systems sowie die Ermittlung von Reaktionskinetiken möglich. Ebenso lassen

sich auf diese Weise Diffusionszeiten durch das Detektionsvolumen messen, die einen Rückschluss auf die Größe des Analytenmoleküls ermöglichen. Mit einem solchen System kann eine Gesamt-Photonensammeleffizienz von 5 bis 10 % bezogen auf die eingestrahlte Photonenzahl erreicht werden. Dies ergibt sich aus einer Absorptionseffizienz der Luminophore von etwa 80 %, einer Emissionswahrscheinlichkeit von etwa 90 % und einer Detektorempfindlichkeit von bis zu 70 %.

Die Steuereinheit ist bei dieser Anwendung vorzugsweise darauf ausgelegt, die Anregungsquelle für ein Zeitintervall  $T_1$  zu aktivieren und nach Verstreichen eines Zeitintervalls  $T_2$  den Detektor für ein Zeitintervall  $T_3$  zu aktivieren. Eine derartige Steuereinheit ist geeignet, eine zeitaufgelöste Lumineszenzmessung zu ermöglichen. Das Zeitintervall  $T_1$ , zu dem die Anregungsquelle aktiviert ist, dient dazu, die auf den Analyten fixierten und somit im Komplex gebundenen Luminophore in einen angeregten Zustand zu überführen, aus dem sie unter Aussendung von Lumineszenzlicht in einen energetisch tieferen Zustand übergehen. Die Karenzzeit  $T_2$  dient dazu, eine spontane Lumineszenz der Probe und/oder des Trägermaterials, die nicht von den zu detektierenden Molekülgruppen ausgeht, aus der Messung auszuschließen.

Der oder die Detektoren sind mindestens während der Messdauer  $T_3$  (und ggf.  $T_4$ ) aktiviert und empfängt vom Fänger/Analyt-Komplex Lumineszenzstrahlung. Die Zeit  $T_3$  wird vorzugsweise zwischen 5 ns und 2 ms gewählt. Während dieser Zeit  $T_3$  werden die Detektorsignale bezüglich Signalthöhe und Zeitpunkt durch eine Aufnahmeeinheit aufgenommen und anschließend ausgewertet. Sofern die Messung an einzelnen oder zumindest sehr wenigen Molekülen durchgeführt wird, erhält man im Zeitintervall  $T_3$  keine klassische Abklingkurve der Lumineszenz, sondern im Falle z.B. eines einzelnen Moleküls einen Signalpeak, der den Zeitpunkt bzw. das Zeitintervall, in dem das individuelle Molekül Strahlung aussendet, kennzeichnet. Dadurch, dass die Messung wiederholt durchgeführt wird, kann eine statistische Auswertung erfolgen, aus der die Lumineszenzlebensdauer ermittelt werden kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann vorgesehen sein, dass die Signale der noch nicht hybridisierten DNS als Fängermolekül und/oder von Detektoren, auf denen keine Fängermoleküle immobilisiert sind, (Hintergrundlumineszenz) und/oder von nicht markierten, d.h. keinen Luminophor aufweisenden Fänger/Analyt-Komplexen (bspw. hybridisierter DNA ohne Luminophor) als Referenz- bzw. Kontrollwerte gespeichert werden, um dann beim eigentlichen

Detektionsereignis mit Luminophor die Möglichkeit zu haben, die aufgenommenen „Störsignale“ aus dem Detektionssignal herauszurechnen (siehe Fig. 4).

Im Rahmen einer statistischen Auswertung können die Intensitäten summiert werden, die in einem bestimmten Zeitintervall innerhalb  $T_3$  erhalten worden sind. Dem Fachmann ist klar, wie er die Methode anwendet. Ergänzend wird auf die Ausführungen der WO 98/09154 hingewiesen.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen sowie unter Bezugnahme auf die angefügten Zeichnungen näher erläutert.

### Beispiele

#### Herstellung eines erfindungsgemäßen Biosensors in Form eines Mikrochips

Der Sensor wird unter Verwendung von 6'' (Inch) Wafern mit einem  $0,5\ \mu\text{m}$  CMOS-Prozeß gefertigt. Jede pn-Photodiode wird in einer n-Wanne auf p-Substrat angeordnet. Nach der Feldoxidation folgen die Definition der p-Gebiete der Photodiode und die Aufbringung der 10 nm dicken Gateoxidschicht. Dann erfolgt die Auflagerung und Strukturierung einer Siliziumdioxid-Schicht. Anschließend werden die weiteren üblichen CMOS-Schritte durchgeführt, wie z.B. das Aufbringen einer Verdrahtungsschicht und die Oberflächenpassivierung (Kratzschutz).

#### Beschichtung des CMOS-Biosensors

Der wie oben hergestellte CMOS-Sensor wird durch Tauchen in eine Lösung von 1% GOPS (Glycidoxypropyltriethoxysilan) und 0,1% Triethylamin in Toluol für eine Zeitdauer von ca. 2 Stunden mit dem Silan beschichtet. Anschließend wird der Mikrochip aus der Lösung entnommen und nach kurzem Abtropfen bei  $120^\circ\text{C}$  für eine Zeitdauer von etwa 2 Stunden im Trockenschrank fixiert. Der so beschichtete Mikrochip kann bis zur Biokonjugation unter Feuchtigkeitsausschluß gelagert werden.

#### Biokonjugation mit Oligonukleotidsonden

Unter Anwendung herkömmlicher Techniken wird der wie oben beschichtete Mikrochip mit 5'-aminomodifizierten Oligonukleotidsonden kontaktlos bedruckt. Die Oligonukleotidsonden werden hierfür in einer Konzentration von  $5\ \mu\text{M}$  in PBS-Puffer gelöst bereitgestellt. Nach dem Bedrucken wird die Kopplungsreaktion bei  $50^\circ\text{C}$  in einer feuchten Kammer fortgesetzt. Anschließend werden

die Mikrochips mit destilliertem Wasser gespült und sodann zum Trocknen mit Methanol gewaschen. Etwaige verbleibende Lösungsmittelreste werden abschließend durch Verdunsten unter dem Abzug entfernt.

#### Probengewinnung

Aus humanen DNA-Isolaten werden mittels PCR Fragmente des Haemochromatose-Gens amplifiziert. Bei der Amplifikation werden geeignete Primersequenzen verwendet, wie sie z.B. im US-Patent 5,712,098 beschrieben sind.

Im Reaktionsmix befinden sich folgende Standardreagenzien (Primer: 0,5  $\mu$ M, dATP, dCTP, dGTP: 0,1mM, dTTP 0,08 mM, PCR-Puffer,  $MgCl_2$ : 4mM, HotStarTaq (Perkin Elmer) 2 Einheiten/ 50  $\mu$ l) plus zusätzlich Biotin-11-dUTP (0,06 mM). Bei der PCR-Reaktion (35 Zyklen, 5 min 95°C, 30 sek 95°C, 30 sek 60°C, 30 sek 72°C, 7 min 72°C) wird das Biotin-dUTP in die neu zu synthetisierende DNA eingebaut. Anschließend wird durch Zugabe von T7 Gen6-Exonuklease (100 Einheiten/ 50  $\mu$ l PCR-Ansatz) und Erhitzen des Ansatzes ( 30 min 37°, 10 min 85°) Einzelstrang-DNA generiert.

#### Hybridisierung

Der obige Reaktionsansatz wird in einem Puffer 5 x SSPE, 0,1% SDS (12  $\mu$ l) unter einem Deckgläschen für eine Zeitdauer von 2 Stunden bei 50° C in der feuchten Kammer auf dem Mikrochip hybridisiert. Anschließend wird mit 2 x SSPE 0,1% SDS gespült und der Mikrochip durch Waschen in Wasser gereinigt.

#### Markierung

Auf den Mikrochip wird zur Markierung eine Markierungslösung gegeben, welche aus 5% BSA, 0,2% Tween 20 und 4x SSC-Puffer besteht und in welcher 0,001 % feste Microspheres (Europium Luminescence Microspheres, Neutravidin-beschichtet 0,04  $\mu$ M, Molecular Probes F 20883) suspendiert sind. Die Reaktion wird für eine Zeitdauer von 30 Minuten unter Agitation mittels Taumler durchgeführt. Anschließend werden gegebenenfalls vorhandene, nicht gebundene Microspheres durch Waschen in 2 X SSC, 0,1 % SDS aus dem Ansatz entfernt.

#### Herstellung Anti-Digoxigenin-IgG beschichteter Micropsheres

0,04  $\mu$ M Fluospheres Platinum Luminescent Microspheres (F20886) werden mit einem monoklonalen Anti-Digoxigenin- IgG-Antikörper (Goat) nach der Vorschrift des Herstellers (Molecular Probes) der Microspheres modifiziert. Die beschichteten Microspheres werden anschließend in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 300 kD mit fünf Pufferwechseln gegen PBS dialysiert.

#### Zweifarbdetektion auf dem Sensorchip

Es werden - wie oben beschrieben - zwei PCR-Produkte erstellt, wobei bei dem einen Produkt das Biotin-11-dUTP gegen Digoxigenin-dUTP äquimolar ersetzt ist. Beide Reaktionsansätze werden in gleicher Weise behandelt und dann in einem 1:1 Gemisch auf dem Mikrochip hybridisiert. Die Markierung erfolgt mit einem 1:1 Gemisch aus den obigen festen Microspheres (Europium Luminescence Microspheres, Neutravidin-beschichtet 0,04  $\mu$ M, Molecular Probes F 20883) und den Antikörper-modifizierten Spheres in dem dort beschriebenen Markierungspuffer. Die Anregung der Platiniunspheres erfolgt bei 400 nm (Lichtquelle: Xenonlampe und Monochromator), während diejenige der Europiunspheres bei 370 nm durchgeführt wird (Xenonlampe und Monochromator). Die Ausleuchtung des Mikrochips erfolgt über einen Lichtleiter und die Lumineszenzspektren der Farbstoffe werden getrennt aufgenommen. Alternativ wird mit UV-LEDs belichtet (ohne Filter) und die Lumineszenzen beider Farbstoffe werden aufgenommen und anschließend über den Verlauf der Lumineszenzabklingkinetik ausgewertet.

### Patentansprüche

1. Optischer Biosensor in Form eines Mikrochip zur Detektion eines Fänger/Analyt-Komplexes mittels Lumineszenz, umfassend
  - (a) einen Träger mit einer Oberfläche, auf der mindestens eine Art von Fängermolekül immobilisiert ist,
  - (b) mindestens einen Detektor, der durch die Oberfläche hindurchtretendes Licht detektieren kann, und
  - (c) wahlweise mindestens eine Anregungsquelle, die die Emission von Lumineszenzlicht induzieren kann,worin die Oberfläche die Messoberfläche des Detektors oder eine Oberfläche einer ohne zwischengeschalteten Wellenlängenfilter für Licht der Anregungsquelle über dem Detektor angeordneten Schicht ist.
2. Biosensor nach Anspruch 1, umfassend eine Anregungsquelle, die einen Luminophor zur Emission von Lumineszenzlicht induzieren kann.
3. Biosensor nach Anspruch 1, worin der Abstand zwischen der Oberfläche und der Messoberfläche des Detektors nicht größer als 10  $\mu\text{m}$  ist.
4. Biosensor nach einem der vorstehenden Ansprüche, worin die Fängermoleküle kovalent an die Oberfläche gebunden sind und/oder der oder die Detektor(en) in den Träger integriert ist bzw. sind.
5. Biosensor nach einem der vorstehenden Ansprüche, worin der oder die Detektoren in Form einer Folie auf den Träger aufgeklebt ist bzw. sind.

6. Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin der oder die Detektor(en) in der Nähe des Mikrochip, räumlich von diesem beabstandet angeordnet ist bzw. sind.
7. Biosensor nach einem der vorstehenden Ansprüche, worin der mindestens eine Detektor eine Photodiode ist, die gleichzeitig als Anregungsquelle dienen kann.
8. Biosensor nach einem der vorstehenden Ansprüche, worin die mindestens eine Art von Fängermolekülen auf der Oberfläche in einzelnen Nachweisfeldern oder in Form eines Rasters immobilisiert ist.
9. Biosensor nach einem der vorstehenden Ansprüche, worin mehrere Arten von Fängermolekülen auf der Oberfläche immobilisiert sind.
10. Biosensor nach Anspruch 8, worin unterschiedliche Fängermoleküle auf unterschiedlichen Nachweisfeldern oder distinkten Positionen des Rasters immobilisiert sind.
11. Biosensor nach einem der vorstehenden Ansprüche, worin die Fängermoleküle ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga, Haptenen, Proteinen, Peptiden, Antikörpern oder deren Fragmenten, Zuckerstrukturen, Rezeptoren oder Liganden.
12. Biosensor nach einem der vorstehenden Ansprüche, zusätzlich umfassend eines oder mehrere Elemente aus der Gruppe, bestehend aus einer Steuereinheit, mindestens einem Verstärker, einem oder mehreren Signalwandlern, einer oder mehreren Speichereinheiten, einem oder mehreren Filtern, einer Optik, Lichtleitern und einer oder mehreren Schutzschichten.
13. Biosensor nach einem der vorstehenden Ansprüche, umfassend mehrere Detektoren.
14. Biosensor nach Anspruch 13, wobei jeder Detektor einem Feld bzw. einer Position des Rasters zugeordnet ist, vorzugsweise indem er unter diesem Feld bzw. der Posi-



tion angeordnet ist und die Größe der Messoberfläche der Feldgröße im Wesentlichen entspricht.

15. Biosensor nach einem der vorstehen Ansprüche, worin die Fängermoleküle innerhalb einer Vertiefung der Oberfläche auf dem Boden derselben angeordnet sind, wobei der Boden der Vertiefung gegenüber der Oberfläche um mindestens 100 nm eingesenkt wird.
16. Verfahren zum Nachweis eines Analyt/Fänger-Komplexes mittels zeitaufgelöster Lumineszenz unter Verwendung eines optischen Biosensors in Form eines Mikrochips, der Biosensor umfassend
  - (a) einen Träger mit einer Oberfläche, auf der mindestens eine Art von Fängermolekül immobilisiert ist,
  - (b) mindestens einen Detektor, der durch die Oberfläche hindurchtretendes Licht detektieren kann, und
  - (c) wahlweise mindestens eine Anregungsquelle, die die Emission von Lumineszenzlicht induzieren kann,worin in Schritt (1) für eine Anregungszeit  $T_1$  an die Fängermoleküle gebundene Luminophore und/oder der Analyt/Fänger-Komplex in einen angeregten Zustand überführt werden, in Schritt (2) für eine Karenzzeit  $T_2$  im wesentlichen nicht angeregt wird und danach in Schritt (3) für eine Zeitspanne  $T_3$  emittiertes Lumineszenzlicht von dem mindestens einen Detektor detektiert und zum Nachweis des Komplexes ausgewertet wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, worin in Schritt (3) verschiedene Analyt/Fänger-Komplexe durch parallele Detektion von Lumineszenzlicht unterschiedlicher Wellenlängen parallel nachgewiesen werden.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, zusätzlich umfassend einem Schritt (4), in dem für eine anschließende Zeitspanne  $T_4$  emittiertes Lumineszenzlicht einer anderen als der in Schritt (3) detektierten Wellenlänge detektiert und zum Nachweis eines zweiten Komplexes ausgewertet wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, worin die Anregung nur in Schritt (1) erfolgt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, worin Schritte (1) bis (3) oder (1) bis (4) mehrfach durchgeführt werden.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20, zusätzlich umfassend einen vorgelagerten Schritt des In-Kontakt-bringens der Fängermoleküle mit einer Probe, von der man annimmt, dass sie einen Liganden der Fängermoleküle als Analyten enthält, und ggf. Waschen der Biosensors.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 21, worin der Ligand mit einem Lumiphor markiert ist und die Detektion nur erfolgt, wenn eine Analyt/Fänger-Komplexbildung stattgefunden hat.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 22, worin die Zeit  $T_1$  1 Nanosekunde bis 2 Millisekunden beträgt.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 23, worin die Zeit  $T_2$  1 Nanosekunde bis 500 Mikrosekunden beträgt.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 24, worin die Zeit  $T_3$  5 Nanosekunden bis 10 Millisekunden beträgt.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 25, worin der Luminophor ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Seltenerdmetallen oder Aktinidmetallen, insbesondere Europium, Terbium, Samarium; Halbleitern der Klassen II-VI, III-V und IV, gegebenenfalls dotiert, insbesondere CdSe, CdS oder ZnS; und Erdalkalimetallfluoriden, insbesondere CaF, und Mischungen derselben.

27. Verfahren nach Anspruch 26, worin der Luminophor in Form von Nanokristallen, Beads oder eines Chelats verwendet wird.
28. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 16 bis 27, zur Detektion einer Nukleinsäure, von Nukleinsäureanaloge, eines Proteins, Peptids, Haptens, Antikörpers oder eines Fragments desselben, einer Zuckerstruktur, eines Rezeptors oder eines Liganden.
29. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche 16 bis 28, worin ein Biosensor nach einem der Ansprüche 1 bis 15 verwendet wird.

1/4

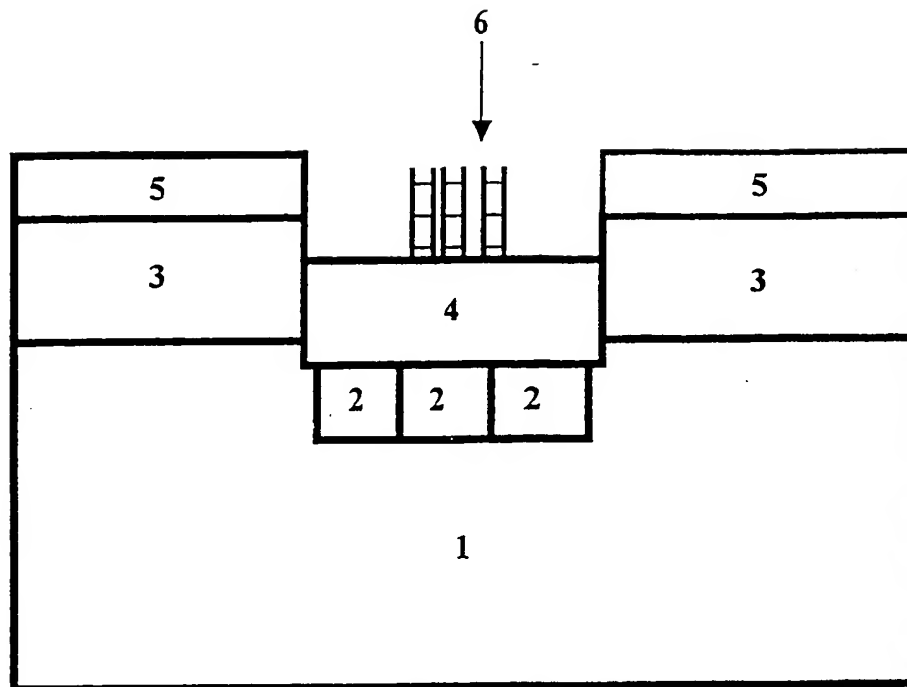


Figure 1

2/4

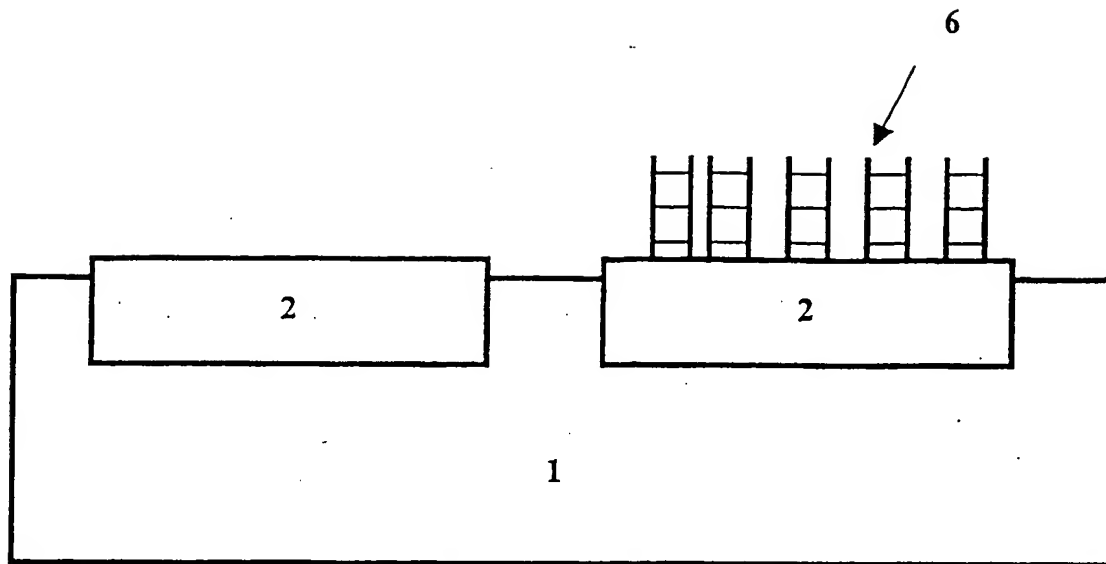


Figure 2

3/4

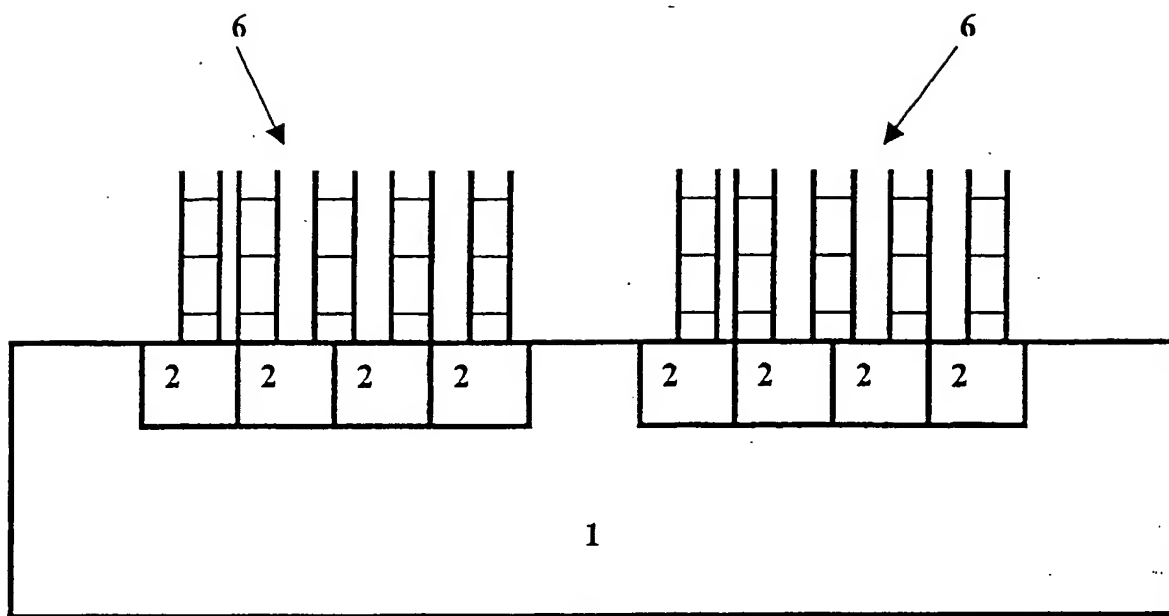


Figure 3

4/4

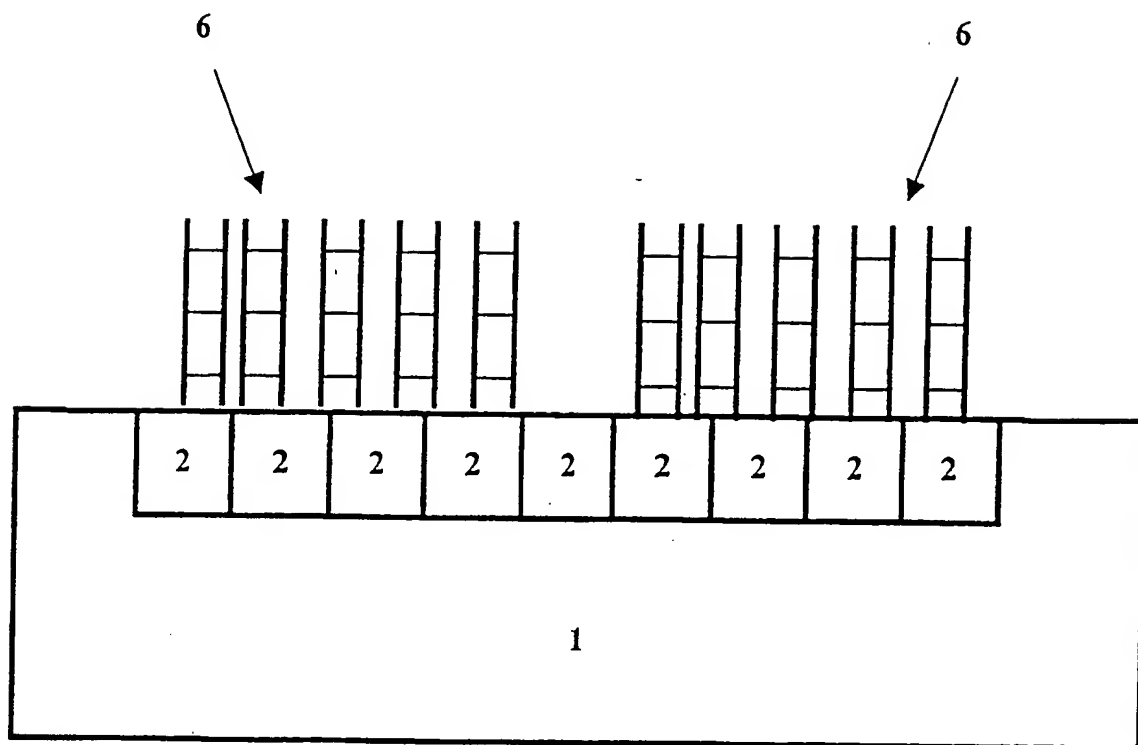


Figure 4

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/543 G01N21/64 G01N33/58 G01N33/00 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 09156 A (CIBA GEIGY AG ;KUNZ RINO ERNST (CH); DUEBENDORFER JUERG (CH); KRAU) 5 March 1998 (1998-03-05)  page 2, paragraph 2 -page 5, paragraph 1 page 10, paragraph 3 -page 15, paragraph 2 page 17, paragraph 5 -page 19, paragraph 4 ---	1,2,4,6, 11,12, 16,21, 22,26, 28,29
X	WO 99 58963 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ;BRUNO RAIMONDI ALFREDO EMILIO (CH);) 18 November 1999 (1999-11-18) page 2, paragraph 2 -page 7, paragraph 4 page 8, paragraph 2 -page 9, paragraph 2 --- -/--	1,2,4,6, 8-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:  <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  28 October 2002		Date of mailing of the international search report  04/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Diez Schlereth, D



C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 75644 A (ABEL ANDREAS P ;EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS AG (CH); NEUSCHAEFER) 14 December 2000 (2000-12-14) page 1, paragraph 1 -page 9, paragraph 2 page 11, paragraph 1 -page 13, paragraph 2 page 19, paragraphs 2,3 page 22, paragraph 6 -page 24, paragraph 4 ---	1,2,4-6, 8-14
X	WO 01 13096 A (ABEL ANDREAS P ;EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS AG (CH); SCHUERMANN M) 22 February 2001 (2001-02-22) page 19, paragraph 5 -page 20, paragraph 5 page 23, paragraph 3 -page 27, paragraph 1 ---	1,2,4-6, 8-14
A	US 6 197 503 B1 (VO-DINH TUAN ET AL) 6 March 2001 (2001-03-06) cited in the application column 2, line 60 -column 3, line 21 column 6, line 36 -column 7, line 15 column 14, line 1 -column 15, line 60 ---	1-29
A	WO 96 35940 A (CIBA GEIGY AG ;BUDACH WOLFGANG (CH); NEUSCHAEFER DIETER (CH); PAWL) 14 November 1996 (1996-11-14) page 26, paragraph 5 ---	1-29
A	WO 99 57310 A (BERNAUER HUBERT S ;BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH (DE)) 11 November 1999 (1999-11-11) page 5, line 9 -page 9, line 10 ---	1-29
A	WO 01 06227 A (PRESENS PREC SENSING GMBH ;KLIMANT INGO (DE)) 25 January 2001 (2001-01-25) the whole document ---	1-29
P,X	WO 02 056023 A (LEINER MARCO JEAN PIERRE ;PRESENS PREC SENSING GMBH (DE); KLIMANT) 18 July 2002 (2002-07-18)  page 1, line 5 -page 3, line 5 page 5, line 15 -page 7, line 31 page 11, line 24-32 ---	1,2,4,6, 11,12, 16,21, 22,26, 28,29
P,X	WO 02 46756 A (ABEL ANDREAS P ;ZEPTOSENS AG (CH); SCHUERMANN MADER EVELINE (CH)) 13 June 2002 (2002-06-13)  abstract -----	1,2,4,6, 11,12, 16,21, 22,26, 28,29

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9809156	A	05-03-1998	AU 4207897 A WO 9809156 A1 EP 0922214 A1 JP 2001504213 T US 6395558 B1	19-03-1998 05-03-1998 16-06-1999 27-03-2001 28-05-2002
WO 9958963	A	18-11-1999	AU 4143099 A WO 9958963 A1 EP 1078248 A1 US 6437345 B1	29-11-1999 18-11-1999 28-02-2001 20-08-2002
WO 0075644	A	14-12-2000	AU 5526500 A WO 0075644 A1 EP 1190236 A1 US 2002074513 A1	28-12-2000 14-12-2000 27-03-2002 20-06-2002
WO 0113096	A	22-02-2001	AU 6834700 A WO 0113096 A1	13-03-2001 22-02-2001
US 6197503	B1	06-03-2001	AU 1609399 A CA 2311466 A1 EP 1236807 A2 EP 1034305 A1 WO 9927140 A1 US 6448064 B1	15-06-1999 03-06-1999 04-09-2002 13-09-2000 03-06-1999 10-09-2002
WO 9635940	A	14-11-1996	AU 5763296 A BR 9608503 A CA 2219769 A1 WO 9635940 A1 EP 0824684 A1 JP 11505610 T PL 323257 A1 US 6289144 B1 US 6078705 A ZA 9603731 A	29-11-1996 06-07-1999 14-11-1996 14-11-1996 25-02-1998 21-05-1999 16-03-1998 11-09-2001 20-06-2000 12-11-1996
WO 9957310	A	11-11-1999	DE 19819537 A1 AU 3825299 A WO 9957310 A2	16-03-2000 23-11-1999 11-11-1999
WO 0106227	A	25-01-2001	DE 19933104 A1 AU 6274900 A WO 0106227 A2 EP 1196780 A2	18-01-2001 05-02-2001 25-01-2001 17-04-2002
WO 02056023	A	18-07-2002	DE 10101576 A1 WO 02056023 A1	12-09-2002 18-07-2002
WO 0246756	A	13-06-2002	AU 1699702 A WO 0246756 A1	18-06-2002 13-06-2002

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/543 G01N21/64 G01N33/58 G01N 60 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 09156 A (CIBA GEIGY AG ;KUNZ RINO ERNST (CH); DUEBENDORFER JUERG (CH); KRAU) 5. März 1998 (1998-03-05)  Seite 2, Absatz 2 -Seite 5, Absatz 1 Seite 10, Absatz 3 -Seite 15, Absatz 2 Seite 17, Absatz 5 -Seite 19, Absatz 4 ---	1,2,4,6, 11,12, 16,21, 22,26, 28,29
X	WO 99 58963 A (NOVARTIS ERFINDE VERWALT GMBH ;BRUNO RAIMONDI ALFREDO EMILIO (CH);) 18. November 1999 (1999-11-18) Seite 2, Absatz 2 -Seite 7, Absatz 4 Seite 8, Absatz 2 -Seite 9, Absatz 2 --- -/--	1,2,4,6, 8-14

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Oktober 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/11/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dietz Schlereth, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH GEGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 75644 A (ABEL ANDREAS P ;EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS AG (CH); NEUSCHAEFER) 14. Dezember 2000 (2000-12-14) Seite 1, Absatz 1 -Seite 9, Absatz 2 Seite 11, Absatz 1 -Seite 13, Absatz 2 Seite 19, Absätze 2,3 Seite 22, Absatz 6 -Seite 24, Absatz 4 ---	1,2,4-6, 8-14
X	WO 01 13096 A (ABEL ANDREAS P ;EHRAT MARKUS (CH); ZEPTOSENS AG (CH); SCHUERMANN M) 22. Februar 2001 (2001-02-22) Seite 19, Absatz 5 -Seite 20, Absatz 5 Seite 23, Absatz 3 -Seite 27, Absatz 1 ---	1,2,4-6, 8-14
A	US 6 197 503 B1 (VO-DINH TUAN ET AL) 6. März 2001 (2001-03-06) in der Anmeldung erwähnt Spalte 2, Zeile 60 -Spalte 3, Zeile 21 Spalte 6, Zeile 36 -Spalte 7, Zeile 15 Spalte 14, Zeile 1 -Spalte 15, Zeile 60 ---	1-29
A	WO 96 35940 A (CIBA GEIGY AG ;BUDACH WOLFGANG (CH); NEUSCHAEFER DIETER (CH); PAWL) 14. November 1996 (1996-11-14) Seite 26, Absatz 5 ---	1-29
A	WO 99 57310 A (BERNAUER HUBERT S ;BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH (DE)) 11. November 1999 (1999-11-11) Seite 5, Zeile 9 -Seite 9, Zeile 10 ---	1-29
A	WO 01 06227 A (PRESENS PREC SENSING GMBH ;KLIMANT INGO (DE)) 25. Januar 2001 (2001-01-25) das ganze Dokument ---	1-29
P,X	WO 02 056023 A (LEINER MARCO JEAN PIERRE ;PRESENS PREC SENSING GMBH (DE); KLIMANT) 18. Juli 2002 (2002-07-18)  Seite 1, Zeile 5 -Seite 3, Zeile 5 Seite 5, Zeile 15 -Seite 7, Zeile 31 Seite 11, Zeile 24-32 ---	1,2,4,6, 11,12, 16,21, 22,26, 28,29
P,X	WO 02 46756 A (ABEL ANDREAS P ;ZEPTOSENS AG (CH); SCHUERMANN MADER EVELINE (CH)) 13. Juni 2002 (2002-06-13)  Zusammenfassung -----	1,2,4,6, 11,12, 16,21, 22,26, 28,29

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9809156	A	05-03-1998	AU	4207897 A	19-03-1998
			WO	9809156 A1	05-03-1998
			EP	0922214 A1	16-06-1999
			JP	2001504213 T	27-03-2001
			US	6395558 B1	28-05-2002
WO 9958963	A	18-11-1999	AU	4143099 A	29-11-1999
			WO	9958963 A1	18-11-1999
			EP	1078248 A1	28-02-2001
			US	6437345 B1	20-08-2002
WO 0075644	A	14-12-2000	AU	5526500 A	28-12-2000
			WO	0075644 A1	14-12-2000
			EP	1190236 A1	27-03-2002
			US	2002074513 A1	20-06-2002
WO 0113096	A	22-02-2001	AU	6834700 A	13-03-2001
			WO	0113096 A1	22-02-2001
US 6197503	B1	06-03-2001	AU	1609399 A	15-06-1999
			CA	2311466 A1	03-06-1999
			EP	1236807 A2	04-09-2002
			EP	1034305 A1	13-09-2000
			WO	9927140 A1	03-06-1999
			US	6448064 B1	10-09-2002
WO 9635940	A	14-11-1996	AU	5763296 A	29-11-1996
			BR	9608503 A	06-07-1999
			CA	2219769 A1	14-11-1996
			WO	9635940 A1	14-11-1996
			EP	0824684 A1	25-02-1998
			JP	11505610 T	21-05-1999
			PL	323257 A1	16-03-1998
			US	6289144 B1	11-09-2001
			US	6078705 A	20-06-2000
			ZA	9603731 A	12-11-1996
WO 9957310	A	11-11-1999	DE	19819537 A1	16-03-2000
			AU	3825299 A	23-11-1999
			WO	9957310 A2	11-11-1999
WO 0106227	A	25-01-2001	DE	19933104 A1	18-01-2001
			AU	6274900 A	05-02-2001
			WO	0106227 A2	25-01-2001
			EP	1196780 A2	17-04-2002
WO 02056023	A	18-07-2002	DE	10101576 A1	12-09-2002
			WO	02056023 A1	18-07-2002
WO 0246756	A	13-06-2002	AU	1699702 A	18-06-2002
			WO	0246756 A1	13-06-2002